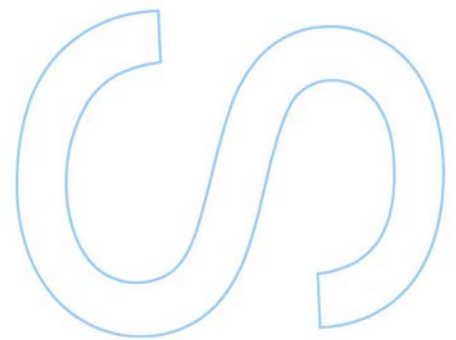
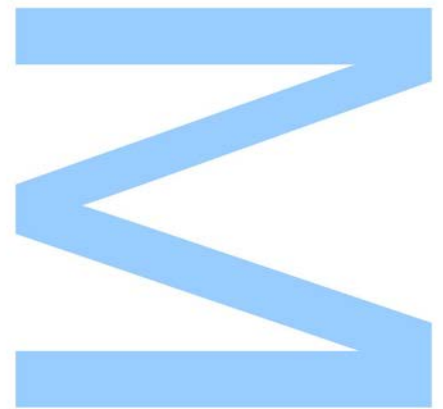


# Biodiversidade de fungos endofíticos em *Halimione portulacoides*

Ana Margarida Freire Aleixo  
Mestrado em Biologia  
Departamento de Biologia  
2013

## Orientador

Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Auxiliar, CESAM,  
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



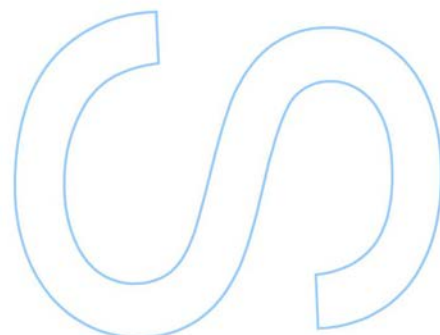
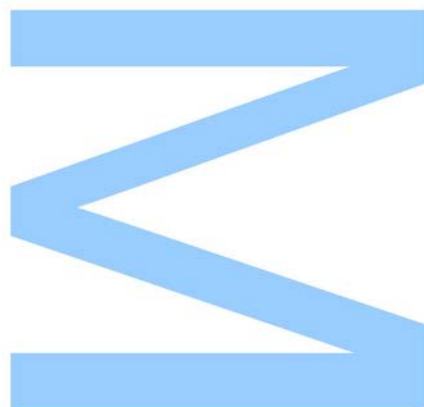




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





# Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo José Talhadas dos Santos, agradeço a forma simples e descomplicada com que sempre esclareceu todas as minhas dúvidas. O entusiasmo com que me falou do Mestrado em Biologia foi o melhor ponto de partida para este caminho trilhado.

À Direção do Centro de Estudos de Fátima, na pessoa do Professor Manuel Bento, agradeço a paciência para todos os “pequenos” pedidos que fui fazendo. E, acima de tudo, pela prontidão com que todos esses pedidos foram atendidos, apesar da suposta recusa inicial, mal disfarçada. Os três vetores orientadores da nossa instituição - Liberdade, Responsabilidade, Respeito - fazem também sentido nestes gestos concretos que permitem aos professores uma gestão que se quer eficiente, da sua vida pessoal e profissional.

Ao Professor Doutor António Correia, agradeço a possibilidade de integrar a equipa de investigação do MicroLab, no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, de uma forma tão natural que me senti perfeitamente “em casa”.

Precisamente no MicroLab, agradeço a todas as colegas que comigo partilharam saberes e pequenas dicas, que sempre demonstraram uma paciência infinita para esclarecer dúvidas e propor novas abordagens ao trabalho que me propus. Não posso deixar de agradecer de forma muito especial à Carla Barradas, que desde o primeiro momento foi uma espécie de “anjo da guarda”, meticulosa e paciente, mesmo quando eu “abusava” na ocupação da bancada e na utilização dos seus reagentes e materiais. Um agradecimento carinhoso também à Carina Félix, pela sua missão de “babysitter” dos fungos, na fase dos testes enzimáticos.

A todos os meus amigos e familiares, agradeço as constantes palavras de incentivo e todo o apoio que demonstraram. À Paula Catarina, agradeço a leitura atenta das versões finais dos meus trabalhos e todos os esclarecimentos na área da química. É na partilha destas pequenas dúvidas que crescemos em ciência. À Diana Costa, a Margarita que veio do outro lado do Atlântico, agradeço os “rabiscos” artísticos que fez, traduzindo no papel o que eu tinha em mente. À Helena Reis, agradeço as dicas no domínio da informática e, acima de tudo, por raramente responder de forma direta às minhas dúvidas, incentivando-me a procurar a resposta de forma autónoma, embora com permanente atenção e acompanhamento.

Para os meus queridos amigos Edite, Francisco e Gabriel, qualquer palavra de agradecimento soará a muito pouco para o tanto que tenho a dizer. Mais do que na vossa casa, vocês acolheram-me num verdadeiro Lar. Sem a vossa amizade e disponibilidade sem limites, seria impossível concretizar este projeto.

Aos meus pais e irmã, um agradecimento profundo por me apoiarem de forma incondicional. Saber que conto com esta família, qualquer que seja o desafio, é por demais encorajador. Sereis sempre o meu suporte!

Por último, precisamente por ser a pedra angular de todo este trabalho, agradeço ao Doutor Artur Alves. O entusiasmo desde o primeiro telefonema, ainda com uma ideia muito embrionária do que poderia resultar deste Mestrado, foi tão significativo! Mais do que uma orientação, senti uma assistência constante, numa dualidade harmoniosa entre a presença efetiva, esclarecedora e motivadora, e o distanciamento prudente e extremamente responsabilizador. Obrigada pela paciência, pela confiança, por todos os ensinamentos. Mas acima de tudo, obrigada pela Amizade!

Este Projeto de mestrado insere-se no âmbito do projeto de investigação “PhytoMarsh – A Fitosfera de plantas de sapal: um “hot-spot” microbiano pouco explorado” financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AAC-AMB/118873/2010) e cofinanciado pelo FEDER, através do Eixo I do Programa Operacional Fatores de Competitividade (POFC) do QREN (COMPETE: FCOMP-01-0124-FEDER-019328).

## Resumo

*Halimione portulacoides* é uma pequena planta arbustiva bastante comum em toda a extensão da Ria de Aveiro. Aliada à sua natural tolerância à salinidade, revela, tal como outras halófitas, uma grande capacidade de sobrevivência em solos contaminados com metais, pelo que pode ser alvo de grande interesse biotecnológico. Esse interesse, contudo, não tem sido acompanhado de forma equitativa por estudos que permitam à comunidade científica munir-se de uma melhor compreensão da complexidade dos mecanismos promotores destas capacidades extraordinárias. Um dos contributos fundamentais que pode abrir novos caminhos à utilização da *H. portulacoides* como motor de fitorremediação e fitoestabilização de solos contaminados é o conhecimento da comunidade microbiana endofítica presente nos tecidos desta planta, principal objetivo do trabalho que aqui se apresenta. Para o efeito foram recolhidas amostras de *H. portulacoides* em 3 locais distintos da Ria de Aveiro. Das raízes, caules e folhas obtiveram-se 111 isolados que após tipagem molecular por BOX-PCR fingerprinting e sequenciação da região ITS do DNA ribossomal, foram divididos em 25 OTUs. Da totalidade dos isolados, 84,7% pertencem ao Filo Ascomycota sendo que, desses, 74,5% integram a Ordem Pleosporales. Os restantes pertencem ao Filo Oomycota, com maior prevalência da espécie *Halophytophthora polymorphica*. As comunidades fúngicas endofíticas revelaram-se consideravelmente diferentes entre locais de amostragem. A espécie *Fusarium incarnatum* foi a única presente nos três locais de amostragem considerados. A análise dos resultados obtidos permite ainda considerar que é inegável a ubiquidade dos fungos, uma vez que estes se mostraram capazes de colonizar os diversos tecidos vegetais estudados. No entanto, verificou-se alguma especificidade ao nível das comunidades endofíticas de cada tecido da planta. Cada isolado foi ainda caracterizado quanto à sua capacidade de produzir atividades enzimáticas extracelulares, nomeadamente amilase, protease, lipase, pectinase, celulase, xilanase, urease e de lacase. Embora grande parte dos isolados tivesse revelado capacidade de produção de diversas enzimas extracelulares, apenas duas OTUs apresentaram capacidade de sintetizar lacases. Estes fungos representam uma fonte relevante de enzimas com potencial aplicação biotecnológica ou industrial.

## Palavras-chave

Plantas halófitas, Ascomycota, Oomycota, diversidade fúngica, sapal, enzimas extracelulares.





## Abstract

*Halimione portulacoides* is a small shrubby plant very common in the area of Ria de Aveiro. Combined with its natural tolerance to salinity, it reveals, as other halophytic plants, a great capacity of survival in soils contaminated with metals, and for that it may be of great biotechnological interest. However, the interest shown hasn't been followed by studies that allow the scientific community to acquire a better understanding of the complexity of mechanisms promoting these extraordinary capacities. One of the main contributions that can open new paths to the use of *H. portulacoides* as a boost of phytoremediation and phytostabilization of contaminated soils is the awareness of the endophytic microbial community present in the tissues of this plant, which is the main aim of the work here shown. For this *H. portulacoides* samples were collected from three distinct places in Ria de Aveiro. 111 isolates were obtained from roots, stems and leaves. After molecular typing by BOX-PCR fingerprinting and sequencing of the ITS region of the ribosomal, these were split into 25 OTUs. From all the isolates, 84,7 % belong to Phylum Ascomycota and of these 74,5 % were assigned to the Order Pleosporales. The remaining isolates belong to Phylum Oomycota with large prevalence of the species *Halophytophthora polymorphica*. Fungal endophytic communities were considerable different between sampling sites. *Fusarium incarnatum* was the only species present in all three sampling sites studied. The results obtained showed a clear ubiquity of fungi since these were able to colonize the different plant tissues analysed. However, there was some degree of specificity at the level of the endophytic communities of each tissue. Each isolate was further characterised regarding its ability to produce extracellular enzymatic activities, namely amylase, protease, lipase, pectinase, cellulase, xylanase, urease and laccase. Although most of the isolates exhibited the capability to produce diverse extracellular enzymes, only two OTUs were able to synthesize laccases. These fungi represent a relevant source of enzymes with potential biotechnological and industrial applications.

## Keywords

Halophytes, Ascomycota, Oomycota, fungal diversity, salt marsh, extracellular enzymes.



# Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Palavras-chave	iii
Abstract	v
Keywords	v
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Introdução	1
Material e Métodos:	7
1. Composição de reagentes de uso geral	7
2. Obtenção de isolados	7
3. Identificação dos isolados	9
4. Análise de diversidade	13
5. Caracterização fisiológica	13
Resultados e Discussão	19
1. Identificação dos isolados	19
2. Análise de diversidade	39
3. Caracterização fisiológica	40
4. Perspetivas futuras	44
Bibliografia	47
Anexos	55
Anexo 1 – “Primers” utilizados	55
Anexo 2 – Marcador de peso molecular	57
Anexo 3 – Identificação dos isolados	59
Anexo 4 – Resultados dos testes enzimáticos	63



# Lista de figuras

Fig. 1 – Fotografia de *Halimione portulacoides*. Lagoa do Paraíso, Aveiro.

Fig. 2 – Localização da Ria de Aveiro, com indicação dos locais das colheitas (adaptado de Google Maps).

Fig. 3 – Representação esquemática do tratamento a que foram sujeitas as diversas porções tecidulares dos exemplares de *Halimione portulacoides* recolhidos.

Fig. 4 – Exemplo da imagem obtida por análise de um gel de agarose, evidenciando o perfil de bandas resultantes da aplicação da técnica de BOX-PCR.

Fig. 5 – Análise de similaridade do perfil de bandas resultantes da técnica de BOX-PCR.

Fig. 6 – Exemplo da imagem obtida por análise de um gel de agarose, evidenciando a banda resultante da aplicação da técnica de ITS-PCR.

Fig. 7 – Esquema da posição dos “primers” ITS1 e ITS4.

Fig. 8 – Relações filogenéticas dos isolados pertencentes ao grupo dos ascomicetos. A análise foi realizada utilizando o método Maximum Likelihood. Foi aplicado o modelo de evolução de DNA “General Time Reversible” (GTR) utilizando uma distribuição gama e permitindo locais invariáveis. São apresentados os valores de bootstrap (%) resultantes da realização de 1000 réplicas.

Fig. 9 – Relações filogenéticas dos isolados pertencentes ao grupo dos oomicetos. A análise foi realizada utilizando o método Maximum Likelihood. Foi aplicado o modelo de evolução de DNA General Time Reversible (GTR) utilizando uma distribuição gama e permitindo locais invariáveis. São apresentados os valores de bootstrap (%) resultantes da realização de 1000 réplicas.

Fig. 10 – Representação gráfica da proporção de cada Ordem.

Fig. 11 – Proporção de OTUs da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três locais de amostragem distintos.

Fig. 12 – Quantificação de cada OTU da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três locais de amostragem.

Fig. 13 – Proporção de OTUs da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três tecidos vegetais: raiz, caule e folhas.

Fig. 14 – Quantificação de cada OTU da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três tecidos vegetais: raiz, caule e folhas.

Fig. 15 – Resultado dos testes de determinação de atividade enzimática.

Fig. 16 – Marcador de peso molecular ([www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)) usado para normalização dos géis de perfis de bandas.

# Lista de tabelas

Tabela I – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de raízes de *Halimione portulacoides*.

Tabela II – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de caules de *Halimione portulacoides*.

Tabela III – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de folhas de *Halimione portulacoides*.

Tabela IV – Distribuição das OTUs identificadas, de acordo com as respectivas Ordens taxonómicas.

Tabela V – Índices de diversidade (R – raíz, C – caule, F – folha).

Tabela VI – Índices de similaridade (R – raíz, C – caule, F – folha).

Tabela VII – Quantificação dos resultados positivos das diversas OTUs relativamente aos testes de determinação de atividade enzimática realizados.

Tabela VIII – Listagem dos “primers” utilizados neste trabalho, com a respetiva sequência nucleotídica.

Tabela IX – Identificação dos isolados obtidos a partir das raízes de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Tabela X – Identificação dos isolados obtidos a partir dos caules de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Tabela XI – Identificação dos isolados obtidos a partir das folhas de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Tabela XII – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de raízes de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).

Tabela XIII – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de caules de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).

Tabela XIV – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de folhas de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).



## Lista de abreviaturas

µl – microlitro

A – adenina

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”

C – citosina

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – cloreto de cálcio dihidrato

CIA – clorofórmio:álcool isoamílico

CTAB – brometo de cetiltrimetilamónio

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP's - desoxirribonucleótidos fosfatados

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EtBr – brometo de etídio

G – guanina

g – aceleração da gravidade na superfície da Terra

HCl – ácido clorídrico

ITS – “Internal Transcribed Spacer”

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monopotássico

l – litro

M – molar

mA – miliampere

mg – miligrama

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio

ml – mililitro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NaNO<sub>3</sub> – nitrato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NH<sub>4</sub>OAc – acetato de amónia

° C – graus Celsius

OTU – “operational taxonomic unit”

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PDA – “Potato Dextrose Agar”

PDB – “Potato Dextrose Broth”

PGP – “plant growth promoter”

pmol – picomol

rDNA – DNA que codifica para rRNA

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal

SDS – dodecil sulfato de sódio

T – timina

TAE – Tris Acetato EDTA

TE – Tris-EDTA

TES – Tris+EDTA+SDS

Tris – trisaminometano

UPGMA – “unweighted pair group method using arithmetic averages”

V – volts



# Introdução

Apesar de reconhecida a existência de microrganismos endofíticos desde os finais do século XIX, (Porras-Alfaro e Bayman, 2011), somente a partir da década de 60 do século XX começam a ser alvo de estudos estruturantes e reconhecedores do seu papel nos ecossistemas. Habitando vários tecidos das plantas de forma assintomática, os fungos endofíticos distinguem-se dos patogénicos por não serem prejudiciais ao seu hospedeiro. No entanto, por manterem os mecanismos genéticos e bioquímicos necessários para o processo de infeção e colonização da planta (Rodriguez e Redman, 1997), podem também ser considerados patogénicos latentes ou saprófitos oportunistas (Porras-Alfaro e Bayman, 2011). Durante muito tempo considerou-se, inclusivamente, não ser evidente o estabelecimento de qualquer relação de benefício, quer para o fungo, quer para a planta hospedeira, pelo que a sua importância ecológica foi algo negligenciada. Schulz *et al.* (2002) apresentam a ideia de que a interação endófito-hospedeiro é um “antagonismo equilibrado”, no qual o efeito não patogénico depende de um equilíbrio entre a virulência dos fungos e as defesas da planta. Este relacionamento pode, no entanto, variar, dependendo das condições ambientais. Atualmente, diversos estudos apontam indubitavelmente para o papel fundamental que os fungos endofíticos exercem em diversos momentos do ciclo de vida de todas as plantas, como, por exemplo, aprimorando as suas habilidades competitivas, e aumentando a resistência a herbivorismo, agentes patogénicos e diversos fatores de stress abiótico (Neto *et al.*, 2002; Porras-Alfaro e Bayman, 2011; Saikkonen *et al.*, 1998). Contudo, esta caracterização está longe de merecer consenso na comunidade científica, uma vez que o mesmo organismo pode ser endofítico numa planta mas ser patogénico noutra espécie e pode acontecer também que alterações ambientais despoletem em organismos endofíticos uma capacidade patogénica latente (Porras-Alfaro e Bayman, 2011). Não obstante esta dúvida, é cada vez mais reconhecida a importância dos fungos endofíticos enquanto fonte de metabolitos secundários com ações tão diversas como atividades antimicrobianas, imunossupressoras ou o combate a doenças como o cancro e a diabetes (Mousa e Raizada, 2013; Pelaéz *et al.*, 1998; Priti *et al.*, 2009; Strobel e Daisy, 2003). A intensificação de estudos relacionados com esta biossíntese, tem permitido aos investigadores perceber que, por um lado, os fungos produzem metabolitos inovadores mas, por outro, também podem produzir as mesmas substâncias dos seus hospedeiros, tornando-se, nestes casos, uma fonte alternativa (Douanla-Meli e Langer 2012; Priti *et al.*, 2009) em termos industriais, com as vantagens inerentes à maior facilidade de manutenção de culturas fúngicas, ao invés de células vegetais de plantas superiores. Sobre esta evidência, recorde-se que uma das drogas mundialmente mais utilizadas no combate a diversos tipos de cancro, o paclitaxel, embora tenha sido descoberta na década de 60 do

século XX, só se tornou economicamente viável e, portanto, passível de ser utilizada em larga escala em tratamentos oncológicos, quando se descobriram fontes alternativas para a sua produção, cerca de 30 anos mais tarde. A descoberta de inúmeras espécies de microrganismos produtores de paclitaxel e de outras moléculas relacionadas evitou a extinção de diversas espécies de teixos (Género *Taxus*) e tornou o processo francamente mais célere e rentável, permitindo a utilização generalizada deste tipo de fármacos oncológicos (Caruso *et al.*, 2000).

Estudos aprofundados de pesquisa de metabolitos produzidos por fungos endofíticos são, portanto, a base da descoberta de novos produtos com aplicabilidade quer na medicina, na agricultura ou em diversas áreas industriais.

*Halimione portulacoides* (L.) Aellen (nome comum gramata-branca – figura 1) é uma planta característica, com grande relevância, da vegetação halofítica das linhas costeiras Atlânticas da Europa e dos estuários Mediterrâneos (Ferrari *et al.*, 1985), pertencente à família Chenopodiaceae. Por ser muito comum mas, igualmente marcante, por ser muitas vezes apontada como bioindicador de contaminação por metais, os estudos com esta macrófita são de extrema importância para a compreensão holística de ecossistemas como os sapais.

Investigações recentes têm focado a sua atenção na forma como esta planta interage com o sedimento, nomeadamente na mobilização de diferentes poluentes do solo (por fitoextração e fitotransformação), demonstrando a sua capacidade de fitorremediação (Duarte *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2009; Válega *et al.*, 2008). Embora a generalidade das plantas típicas destes ecossistemas seja dotada de capacidades de sequestro de mercúrio dos sedimentos estuarinos, a *Halimione portulacoides* parece acumular maior quantidade deste metal no seu sistema radicular (Coelho *et al.*, 2009).



Fig. 1 – Fotografia de *Halimione portulacoides*. Lagoa do Paraíso, Aveiro.

Reconhecendo o papel fundamental que a comunidade fúngica representa nestas capacidades ecológicas, considera-se o seu estudo de extrema importância mas a realidade é que são ainda bastante escassos os trabalhos publicados nesta temática. Na verdade, os únicos que se conhecem, estruturantes e específicos com *Halimione portulacoides* datam já dos anos 60 do século XX (Dickinson, 1965; Dickinson e Pugh, 1965a; Dickinson e Pugh, 1965b; Dickinson e Morgan-Jones, 1966). Nestes estudos são identificados vários fungos associados à planta, tenta-se compreender o seu papel na associação que estabelecem com os diversos tecidos do hospedeiro e admite-se a influência de fatores externos, próprios da componente abiótica do ecossistema, no estabelecimento da comunidade fúngica associada a esta planta.

Os trabalhos publicados por Dickinson e seus colaboradores são igualmente importantes para a micologia em termos gerais, na medida em que os seus autores especulam sobre a relação entre os fungos e as doenças das diversas plantas em que são encontrados, assim como sobre a possibilidade de estes microrganismos produzirem substâncias com características antimicrobianas, para fazerem frente ao antagonismo entre patogénicos e saprófitos que partilham o mesmo hospedeiro (Dickinson, 1965). Não obstante a justificação deste tópico de investigação, não se conhecem desde então mais estudos publicados que relacionem a *Halimione portulacoides* com a respetiva comunidade de fungos endofíticos.

A generalidade dos trabalhos produzidos é de publicação recente e centra-se essencialmente nos estudos com plantas medicinais, como *Diospyros crassiflora* (Douanla-Meli e Langer 2012), *Cannabis sativa* (Kusari *et al.*, 2013), *Taxus globosa* (Soca-Chafre *et al.*, 2011), etc ou de ambientes específicos, como Antártida (Loperena *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013) e zonas tropicais (Choi *et al.*, 2005; Rajulu *et al.*, 2013; Sakayaroj *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2008). Considera-se, portanto que, embora legitimando a sua diversidade e importância, os fungos endofíticos e o seu significado ecológico mantêm-se pouco estudados. O trabalho desenvolvido no âmbito deste Mestrado, que aqui se apresenta, pretende minimizar essa lacuna, assumindo-se como uma tentativa de contribuir para o conhecimento da comunidade endofítica de uma planta de sapal, e o estudo do seu potencial biotecnológico.

Foram recolhidas plantas de locais diferentes da Ria de Aveiro procurando, desta forma, perceber até que ponto determinadas especificidades ecológicas (nomeadamente a ocupação antrópica) são determinantes para a referida biodiversidade endofítica.

A Ria de Aveiro é uma lagoa costeira portuguesa, localizada na costa oeste, sob influência do oceano Atlântico através de uma ligação única e rodeada de diversos aglomerados populacionais e industriais (Pereira *et al.*, 2009). Sendo um ecossistema estuarino

com marcada influência salina, está entre um dos ambientes mais produtivos, abrigando diversas comunidades que, não primando pela diversidade, têm um potencial ecológico inestimável (Constanza *et al.*, 1997), nomeadamente na capacidade constante de restabelecer o equilíbrio.

A existência de plantas com capacidade de remediação de problemas ambientais, como a carga excessiva de metais poluentes (Válega *et al.*, 2008) evita em larga escala que o efeito nocivo desses materiais trespassse para outros elementos do próprio ecossistema e de ecossistemas limítrofes. Estudos que permitam conhecer e caracterizar a complexidade de relações bióticas associadas a estas plantas poderão contribuir de forma significativa para o desenvolvimento biotecnológico futuro (Neto *et al.*, 2002), uma vez que, segundo Strobel e Daisy (2003), organismos sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais produzem mais metabolitos secundários do que outros, típicos de ambientes com maior estabilidade.

Da grande diversidade de subsistemas que compõem o ecossistema da Ria de Aveiro, considerou-se pertinente a seleção de diversos aglomerados de *Halimione portulacoides* nos canais junto da Lagoa do Paraíso (local A), com notória interação antrópica e influência de outras espécies botânicas. Em paralelo, selecionaram-se exemplares do Largo do Laranjo, Murtosa (local B e local E, no mapa da figura 2), locais onde a ação humana direta é pouco significativa, onde a comunidade florística é pouco diversificada e onde é evidente a contaminação por mercúrio, resultante de descargas ocorridas na segunda metade do século XX, provenientes do complexo industrial de Estarreja. (Coelho *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Válega *et al.*, 2008). Vários trabalhos preliminares (Pereira *et al.*, 2009; Válega *et al.*, 2009) mostram que, dos locais escolhidos no presente estudo, a maior concentração de mercúrio está patente no local B, seguido do local E e, por fim, o local A (onde a presença deste metal altamente tóxico, com ação mutagénica e teratogénica (Coelho *et al.*, 2009) é perfeitamente desprezável).

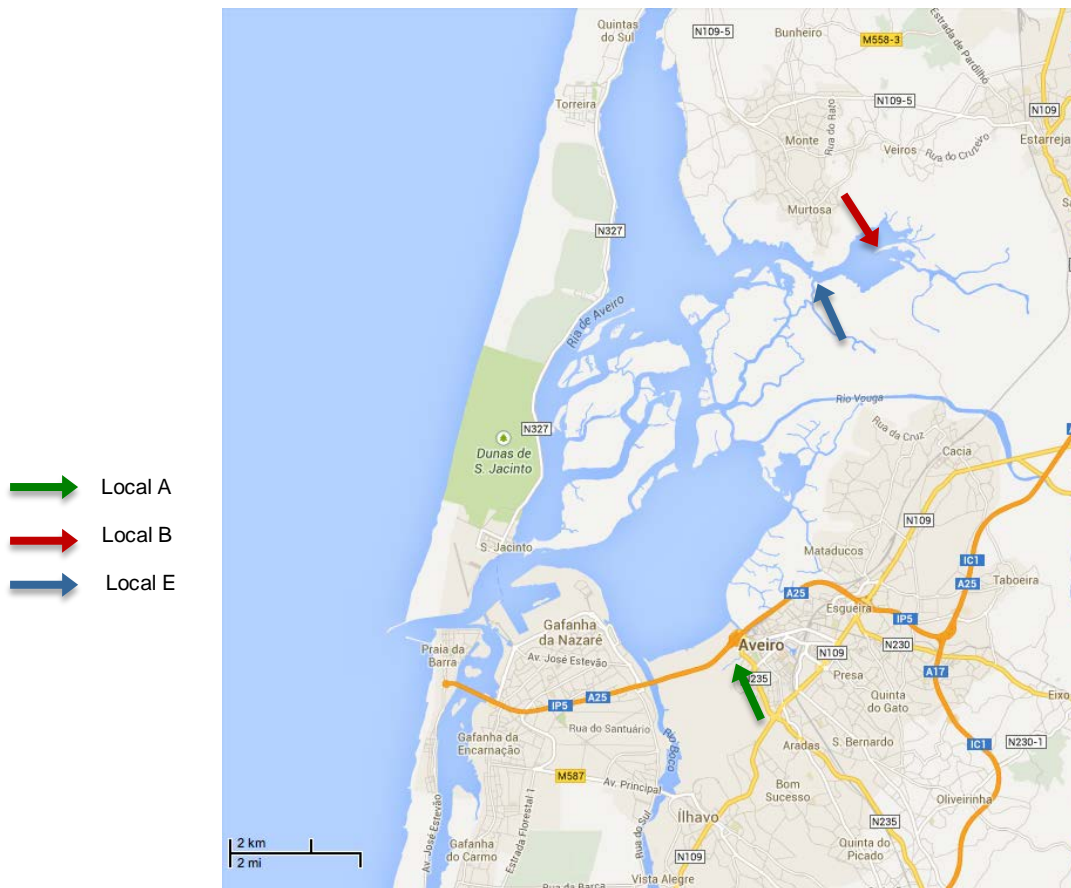


Fig. 2 – Localização da Ria de Aveiro, com indicação dos locais das colheitas (adaptado de Google Maps).

Concretizando, define-se como objetivo geral deste trabalho a avaliação da diversidade do microbioma endofítico em *Halimione portulacoides*. De forma específica, pretende-se comparar a comunidade de fungos endofíticos de diferentes tecidos vegetais, bem como de plantas oriundas de locais distintos.





# Material e Métodos:

## 1. Composição de reagentes de uso geral

### TE:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (pH 8,0)

### TAE 1x:

40 mM Tris base

40 mM Acetato

2 mM EDTA (pH 8,0)

(**Nota:** solução “stock” preparada a 50x).

### CIA:

Clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1.

## 2. Obtenção de isolados

O primeiro passo neste esforço de estudar a biodiversidade da comunidade de fungos endofíticos em *Halimione portulacoides* passou por selecionar três plantas com aspeto saudável, em três locais da Ria de Aveiro: diversos aglomerados junto da Lagoa do Paraíso (colheitas realizadas nos dias 30 de julho e 31 de agosto de 2012) e exemplares de dois locais distintos do Largo do Laranjo, Murtosa (colheitas realizadas no dia 20 de novembro de 2012).

Diversas porções das três amostras recolhidas em cada um dos três locais (mapa da figura 2) foram sujeitas a tratamento sequencial com hipoclorito de sódio 5%, etanol 70% e água estéril (adaptado de Azevedo *et al.*, 1998; Bacon *et al.*, 2002), seguindo a representação esquemática da figura 3. Pretendeu-se, desta forma, eliminar a comunidade epifítica da planta.

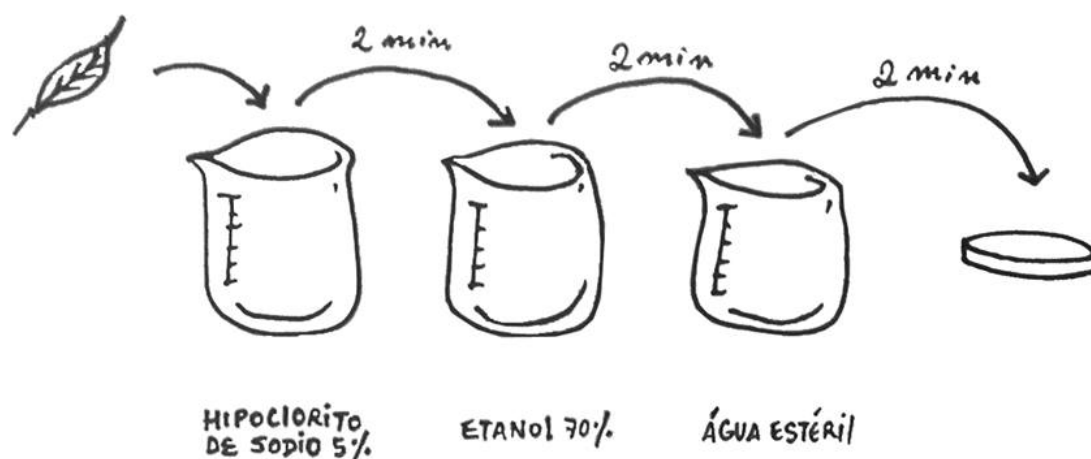


Fig. 3 – Representação esquemática do tratamento a que foram sujeitas as diversas porções tecidulares dos exemplares de *Halimione portulacoides* recolhidos.

De seguida fragmentos dos tecidos em estudo foram colocados, sob condições de assepsia, em placas de Petri, contendo meio PDA, apropriado para o crescimento de fungos. O meio de cultura foi preparado segundo as indicações dos fabricantes, sendo a sua composição apresentada para volumes de 1 litro. Após a preparação o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

---

#### PDA – Potato Dextrose Agar

- 27 g PDB (200 g infusão de batata; 20 g glucose)
  - 15 g Agar-agar
- 

As diversas colónias emergentes foram depois transferidas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, contribuindo para o seu isolamento. Esta transferência ocorreu sempre que fosse possível identificar novas colónias emergentes dos tecidos vegetais, mantendo-se ao longo de cerca de duas semanas (enquanto foi possível distinguir o crescimento de novas colónias). Assim, foi possível isolar, quer os microrganismos com crescimento mais rápido, quer aqueles que apresentam um crescimento mais lento. Em todos estes procedimentos a incubação decorreu à temperatura ambiente.

### 3. Identificação dos isolados

#### 3.1 Extração do DNA genómico

Procedeu-se à extração do DNA total de cada isolado, segundo uma adaptação do protocolo descrito por Möller *et al.* (1992).

---

##### **Extração do DNA genómico, segundo Möller (modificado)**

1. Permitir o crescimento de fungos num meio adequado ao desenvolvimento de micélio.
  2. Transferir o micélio para um tubo de 2,2 ml e adicionar 500 µl de tampão TES.
  3. Misturar, deixar ferver (100 °C – 110 °C) durante 3 minutos e, de seguida, colocar em gelo durante 10 minutos.
  4. Adicionar 10 µl de proteinase K (20mg/ml)
  5. Incubar a 65 °C durante 30 minutos (agitando ocasionalmente)
  6. Aumentar a concentração salina, adicionando 140 µl 5M NaCl.
  7. Adicionar 65 µl 10% CTAB.
  8. Agitar por inversão até ficar branco leitoso.
  9. Incubar a 65 °C durante 30 minutos (agitar ocasionalmente).
  10. Adicionar 1ml clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (CIA) e misturar com cuidado, por inversão, durante 1 minuto.
  11. Incubar durante 30 minutos em gelo.
  12. Centrifugar durante 10 minutos a 12 000 rpm a 4 °C.
  13. Transferir sobrenadante (800 µl) para um novo tubo de 1.5 ml.
  14. Adicionar 225 µl 5M NH<sub>4</sub>OAc (acetato de amónia) e misturar gentilmente.
  15. Incubar durante 30 minutos em gelo.
  16. Centrifugar durante 10 minutos a 12 000 rpm a 4 °C.
  17. Transferir o sobrenadante (1000 µl para um novo tubo de 1.5 ml).
  18. Adicionar 500µl de isopropanol gelado e misturar cuidadosamente.
  19. Incubar durante 30 minutos em gelo.
  20. Centrifugar diretamente durante 10 minutos a 12 000 rpm a 4°C.
  21. Rejeitar o sobrenadante.
  22. Com o tubo virado, deixar secar.
  23. Dissolver o “pellet” em cerca de 50 µl de tampão TE.
  24. Guardar os tubos a -20 °C.
-

### 3.2 Tipagem genética por PCR (BOX-PCR)

A totalidade dos isolados foi alvo de uma tipagem genética com recurso à técnica de BOX-PCR fingerprinting.

Todas as reações de PCR foram efetuadas em volumes de 25 µl usando reagentes (NZYtaq 2x Green Master Mix, contendo tampão, dNTP's, MgCl<sub>2</sub> e enzima *Taq* DNA polimerase) e “primer” BOXA1R (Alves *et al*, 2007, ver anexo 1) fornecidos, respetivamente, pelas empresas NZYtech e MWG-Biotech AG e decorreram num termociclador MyCycler™ (Bio-Rad).

---

#### BOX-PCR

1. Preparar a seguinte reação de amplificação: 25 µl
    - 15,75 µl água
    - 6,25 µl Mix (NZYtaq 2x Green Master Mix)
    - 2 µl “primer” BOXA1R (10 pmol/ µl)
  2. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de PCR: desnaturação inicial a 95°C, durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos que compreendem 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de “annealing” a 53°C e 8 minutos de extensão a 65°C. Por fim, alongamento final a 65°C, durante 16 minutos, findos os quais, os tubos poderão ser mantidos a 15°C.
  3. Observar cerca de 5 µl de cada reação de PCR num gel de agarose a 1,5 % em TAE 1x, sujeito a eletroforese sob as seguintes condições: 80 V, durante 165 minutos.
- 

### 3.3 Amplificação da região ITS

Para amplificar por PCR a região genómica ITS foram utilizados os “primers” ITS1 e ITS4 (White *et al*, 1990, ver anexo 1). Todas as reações de PCR foram efetuadas em volumes de 25 µl usando reagentes (NZYtaq 2x Green Master Mix, contendo tampão, dNTP's, MgCl<sub>2</sub> e enzima *Taq* DNA polimerase) e “primers” ITS1 e ITS4 fornecidos, respetivamente, pelas empresas NZYtech, StabVida e MWG-Biotech AG e decorreram num termociclador MyCycler™ (Bio-Rad).

---

### ITS-PCR

4. Preparar a seguinte reação de amplificação: 25 µl
    - 15,75 µl água
    - 6,25 µl Mix (NZYTaq 2x Green Master Mix)
    - 1 µl “primer” ITS1 (10 pmol/µl)
    - 1 µl “primer” ITS4 (10 pmol/µl)
  5. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de PCR: desnaturação inicial a 95°C, durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que compreendem 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de “annealing” a 50°C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C. Por fim, alongamento final a 72°C, durante 10 minutos, findos os quais, os tubos poderão ser mantidos a 15°C.
  6. Observar cerca de 5 µl de cada reação de PCR num gel de agarose a 1,5 % em TAE 1x, sujeito a eletroforese sob as seguintes condições: 80 V, durante 80 minutos.
- 

## 3.4 Visualização do DNA

Terminada a eletroforese os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5µg/ml, em tampão de eletroforese. Quando necessário lavaram-se os géis em água destilada para eliminar o excesso de EtBr.

Após a coloração, cada gel foi visualizado com recurso ao “Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software” (Bio-Rad).

## 3.5 Purificação dos produtos de amplificação

Os produtos resultantes das reações de PCR destinados à sequenciação foram purificados pelo método que se descreve de seguida, utilizando o kit DNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH).

---

### Purificação de DNA

1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA: adicionar 125 µl (5 volumes) de “DNA Binding Buffer” à reação de amplificação e misturar fortemente.
  2. CARREGAMENTO: Carregar cada amostra para um tubo de lavagem fornecido pelo kit (Zymo-Spin™ Column). Centrifugar a uma velocidade entre 10000 g e 16000 g durante 30 segundos. Descartar o líquido do tubo.
  3. LAVAGEM: Adicionar 200 µl de “DNA Wash Buffer” a cada coluna. Centrifugar a uma velocidade entre 10000 g e 16000 g durante 30 segundos. Descartar o líquido. Repetir este passo de lavagem.
  4. ELUIÇÃO DO DNA: Adicionar 25 µl de água estéril pré-aquecida a 60-70 °C, diretamente no centro da coluna e incubar à temperatura ambiente durante cerca de 1 minuto. Transferir cada coluna para um tubo de 1,5 ml e centrifugar a uma velocidade entre 10000 g e 16000 g durante 30 segundos.
- 

## 3.6 Determinação da sequência nucleotídica

A determinação da sequência nucleotídica dos produtos de amplificação da região ITS foi realizada na firma GATC Biotech (Alemanha). Os cromatogramas foram visualizados e editados com recurso ao programa FinchTV (Geospiza). A identificação dos isolados foi efetuada por comparação com as sequências ITS depositadas na base de dados GenBank através da ferramenta bioinformática BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), acessível on-line em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## 3.7 Análise computacional

Os perfis de bandas foram analisados com recurso ao programa GelCompar II (Applied Maths). Utilizando o marcador de peso molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix (ver anexo 2) em ambas as extremidades do gel, procedeu-se à normalização dos géis. A opção “rolling disk” foi utilizada para subtração do “background”. As bandas de DNA foram detetadas pelo software

e cuidadosamente verificadas por inspeção visual de modo a corrigir possíveis detecções insatisfatórias. Os níveis de similaridade dos perfis foram calculados usando o coeficiente de Pearson, criando uma matriz de similaridade. A partir desta matriz foi gerado um dendrograma pelo método UPGMA (“unweighted pair group method using arithmetic averages”).

As sequências de ITS foram alinhadas com recurso ao programa ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007), sendo selecionadas além das estirpes obtidas, sequências de estirpes depositadas na base de dados do GenBank. Este alinhamento múltiplo de sequências foi posteriormente submetido a uma análise filogenética utilizando o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Na análise filogenética foi utilizado o método de “maximum-likelihood” e o modelo de evolução de DNA mais adequado tal como determinado pelo programa MEGA5.

#### 4. Análise de diversidade

A diversidade das comunidades de fungos endofíticos presentes em cada local e tecido foi estimada utilizando os índices de diversidade de Shannon, Simpson e Margalef. Para avaliar a similaridade das comunidades entre os três locais e tecidos foram calculados os índices de Jaccard, Sorensen e Bray-Curtis (Magurran, 2004).

#### 5. Caracterização fisiológica

A deteção de atividades enzimáticas extracelulares foi realizada após cultivo de cada isolado em placa de meio agarizado contendo substrato adequado para avaliação das seguintes atividades enzimáticas: atividade amilolítica, proteolítica, lipolítica, pectinolítica, de celulase, de xilanase, de urease e de lacase. Os ensaios realizados permitem avaliar a produção de enzimas extracelulares pelo aparecimento de halos transparentes, ou modificação do meio de cultura, como alteração de cor, produção de precipitados, ou outros (Hankin e Anagnostakis; 1975; St Leger *et al.*, 1997; Rigling, 1995).

## 5.1 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as seguintes composições, apresentadas para volumes de 1 litro.

✓ **Agar de amido (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)**

Peptona 10 g  
 Extrato de levedura 5 g  
 NaCl 5 g  
 Amido 2 g  
 Bacto-agar 15 g (pH 6,8)

✓ **Meio de Skim Milk**

Skim milk 10 g  
 Extrato de malte 5 g  
 Bacto-agar 15 g (pH 7,2 +/- 0,2)

(**Nota:** Esterilizar a solução de skim milk separadamente e adicionar ao restante meio antes de usar).

✓ **Meio de lipases (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)**

Peptona 10 g  
 NaCl 5 g  
 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 g  
 Tween 20 1%  
 Bacto-agar 20 g (pH 6,0)

(**Nota:** Esterilizar o Tween 20 separadamente e adicionar 1 ml por cada 100 ml de meio).

✓ **Meio de pectina (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975 e St Leger et al., 1997)**

Meio mínimo: (0,3% NaNO<sub>3</sub>; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>; pH 6,0)  
 Extrato de levedura 1 g  
 Pectina 5 g  
 Bacto-agar 15 g (pH 7,0 ou 5,0)



✓ **Meio de celulose (adaptado de St Leger et al., 1997)**

Meio mínimo: (0,3% NaNO<sub>3</sub>; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>; pH 6,0)

Extrato de levedura 1 g

CM-celulose 5 g

Bacto-agar 15 g

✓ **Meio de xilano (adaptado de St Leger et al., 1997)**

Meio mínimo: (0,3% NaNO<sub>3</sub>; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>; pH 6,0)

Extrato de levedura 1 g

Xilano 5 g

Bacto-agar 15 g

✓ **Agar de ureia (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)**

Peptona 1 g

D(+) glucose 1 g

NaCl 5 g

Fosfato potássio monobásico 2 g

Ureia 20 g

Vermelho de fenol 0,012 g

Agar 15 g (pH 6,8 +/- 0,1)

(**Nota:** Arrefecer a 45-55 °C e adicionar 50 ml/l de uma solução de ureia a 40%, esterilizada por filtração).

✓ **Meio TAM (adaptado de Rigling, 1995)**

Ácido tânico 10 g

Extrato de malte 15 g

Bacto-agar 20 g

(**Nota:** A solução de ácido tânico (pH 4,5 ajustado com NaOH) e de extrato de malte agarizado são esterilizadas separadamente e arrefecidas até 50 °C antes de misturadas).

## 5.2 Detecção de atividades enzimáticas extracelulares

A detecção da produção de enzimas extracelulares, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo os procedimentos a seguir descritos:

✓ Detecção de atividade amilolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Agar de Amido, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. Revelar a hidrólise do amido, inundando a placa com soluto de Lugol. O meio de cultura adquire coloração azulada após reação com o soluto de Lugol nas zonas onde não ocorre hidrólise e apresenta-se acastanhado a claro nas zonas hidrolisadas.

✓ Detecção de atividade proteolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Skim Milk, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. A produção de proteases é detetada pelo aparecimento de halos transparentes em volta do micélio.

✓ Detecção de atividade lipolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Lipases, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. A produção de enzimas lipolíticas é revelada pela presença de um precipitado, devido à formação de cristais a partir do sal de cálcio do ácido láurico libertado pela enzima. Por vezes, o precipitado em volta do micélio desaparece, devido à degradação total do sal.

✓ Detecção de atividade pectinolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Pectina pH 5,0 e pH 7,0, com a estirpe a testar. Este meio, a pH 5,0 permite a detecção de pectinase, e a pH 7,0 permite a detecção de liase do pectato.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. Revelar a hidrólise da pectina, inundando a placa com uma solução de CTAB a 1%. Este reagente precipita a pectina intacta, revelando assim zonas de hidrólise transparentes, em volta do micélio.

✓ Deteção de atividade celulolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Celulose, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. Para revelar as zonas de hidrólise, corar durante 15 minutos com uma solução de Vermelho do Congo 1 mg/ml. De seguida, descorar com NaCl 1 M.

✓ Deteção de atividade xilanolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Xilano, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. Para revelar as zonas de hidrólise, corar durante 15 minutos com uma solução de Vermelho do Congo 1 mg/ml. De seguida, descorar com NaCl 1 M.

✓ Deteção de atividade de urease

1. Inocular uma placa de Petri contendo Agar de Ureia, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. Se a estirpe for urease positiva desenvolve-se cor vermelha devido à presença do indicador vermelho de fenol e de amónia; se for urease negativa não se observa alteração de cor.

✓ Deteção de atividade de lacase

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio TAM, com a estirpe a testar.
2. Incubar a 25 °C durante 2 semanas.
3. A produção de lacase é indicada pela coloração castanha do meio de cultura em volta do micélio.



# Resultados e Discussão

## 1. Identificação dos isolados

As amostras recolhidas foram esterilizadas e preparadas de forma a permitir o crescimento e posterior isolamento de fungos que habitualmente se encontram no interior dos tecidos vegetais – raízes, caules e folhas. Este tratamento permitiu a eliminação dos microrganismos epifíticos, ou seja, dos microrganismos que, de forma natural, vivem na superfície desta planta e cujo estudo não se enquadra nos objetivos propostos. A utilização inicial de tecidos saudáveis visa, por um lado, a recolha dos endofíticos propriamente ditos (por definição, vivem no interior dos tecidos vegetais) e, por outro, minimizar o crescimento de patogénicos (Bacon *et al.*, 2002).

Na identificação dos isolados rejeitou-se de imediato qualquer abordagem morfológica. Na verdade, vários indícios mostram que isolados da mesma espécie de fungo apresentam grande diversidade fenotípica (Azevedo *et al.*, 1998). Por outro lado, nem todos os fungos formam esporos em cultura (Angelini *et al.*, 2012; Porras-Alfaro e Bayman, 2011; Rosa *et al.*, 2010), pelo que esta abordagem também não se revelaria adequada. Pelas razões expostas, optou-se pela utilização de técnicas moleculares, nomeadamente o isolamento de DNA, amplificação e sequenciação de uma região específica (região ITS do rDNA) e comparação dos resultados com informações presentes em bases de dados.

A partir dos diferentes tecidos vegetais foram obtidos 111 isolados. Estes foram alvo de uma tipagem genética com recurso à técnica de BOX-PCR fingerprinting. Os produtos de amplificação, após separação por electroforese em gel de agarose, originaram perfis de bandas (figura 4) que são discriminatórias ao nível da espécie/estirpe (Alves *et al.*, 2007). Utilizando o software GelCompar II (Applied Maths) os perfis de bandas foram sujeitos a uma análise de similaridade (figura 5), a partir da qual se pretendeu identificar grupos e selecionar isolados representativos de cada grupo, para posterior identificação molecular ao nível da espécie.

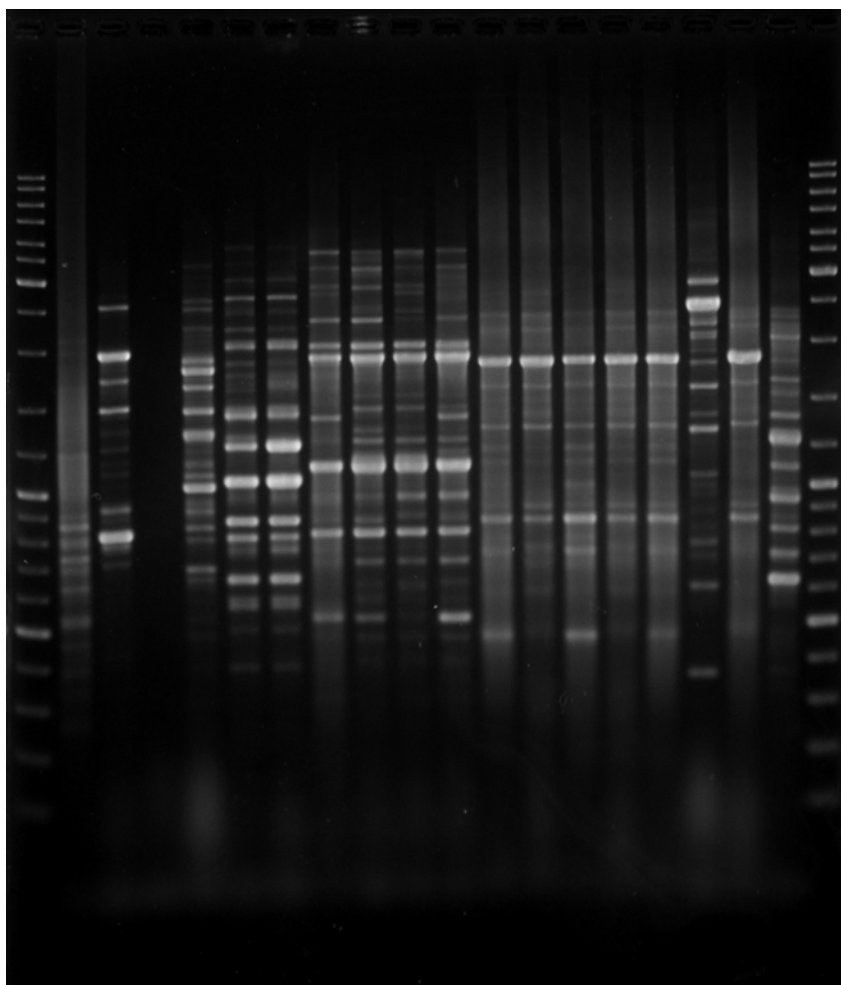


Fig. 4 – Exemplo da imagem obtida por análise de um gel de agarose, evidenciando o perfil de bandas resultantes da aplicação da técnica de BOX-PCR.

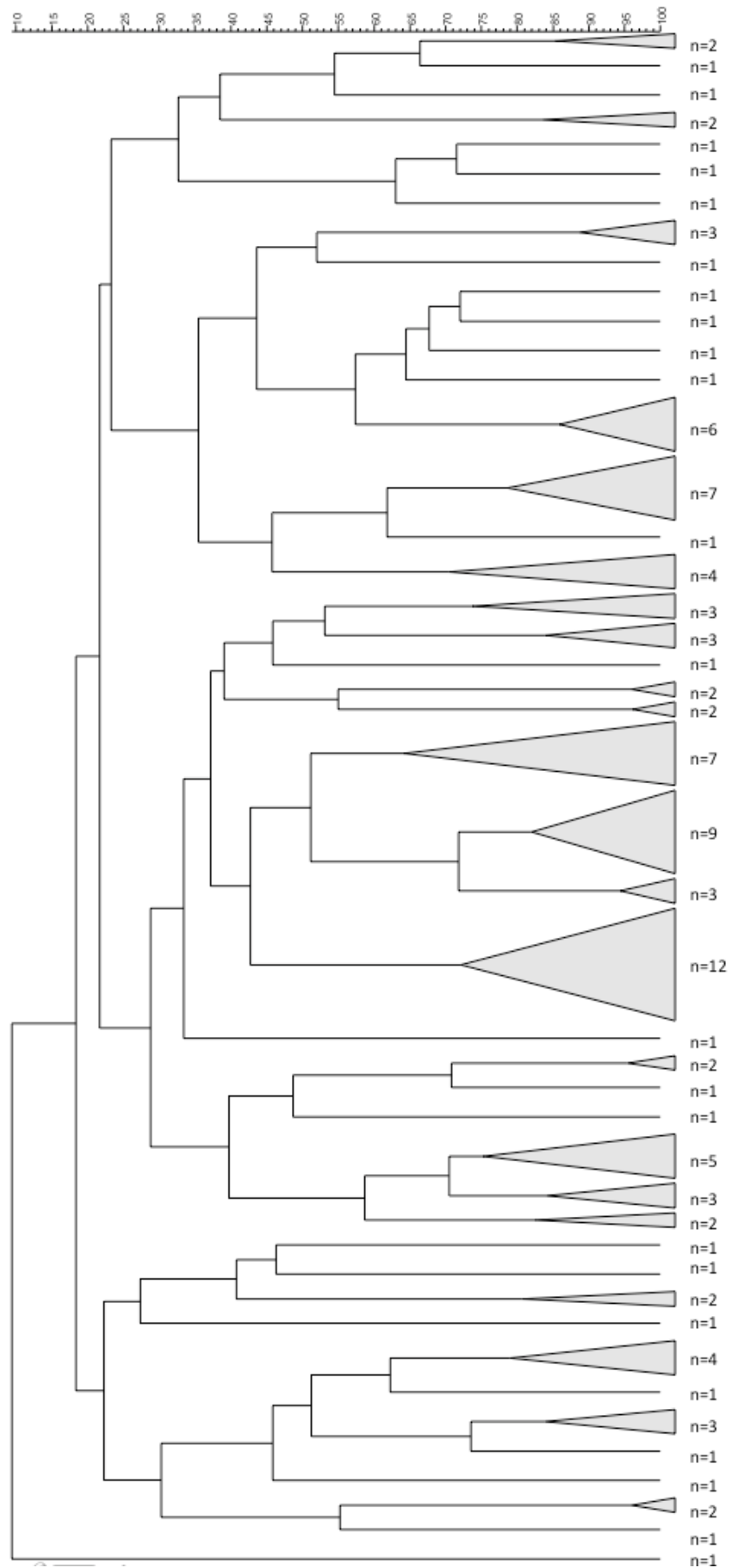


Fig. 5 – Análise de similaridade do perfil de bandas resultantes da técnica de BOX-PCR.

De cada isolado selecionado, foi amplificada a região ITS do gene que codifica para rRNA, com vista à determinação da respetiva sequência nucleotídica. Esta região é considerada o marcador filogenético de eleição para identificação de espécies de fungos (Bugni e Ireland, 2004; Nilsson, *et al.*, 2008). Sujeitando o produto da técnica de ITS-PCR a uma eletroforese em gel de agarose, cada amostra revela a presença de uma banda, reveladora da amplificação (figura 6), uma vez que os primers utilizados (primers ITS1 e ITS4) usam regiões conservadas dos genes rRNA 18S e rRNA 28S, respetivamente, para amplificar regiões não codificantes entre eles, como mostra o esquema da figura 7. Estas regiões não codificantes (ITS) evoluem de forma rápida e podem apresentar grandes variações entre espécies do mesmo género (White *et al.*, 1990).

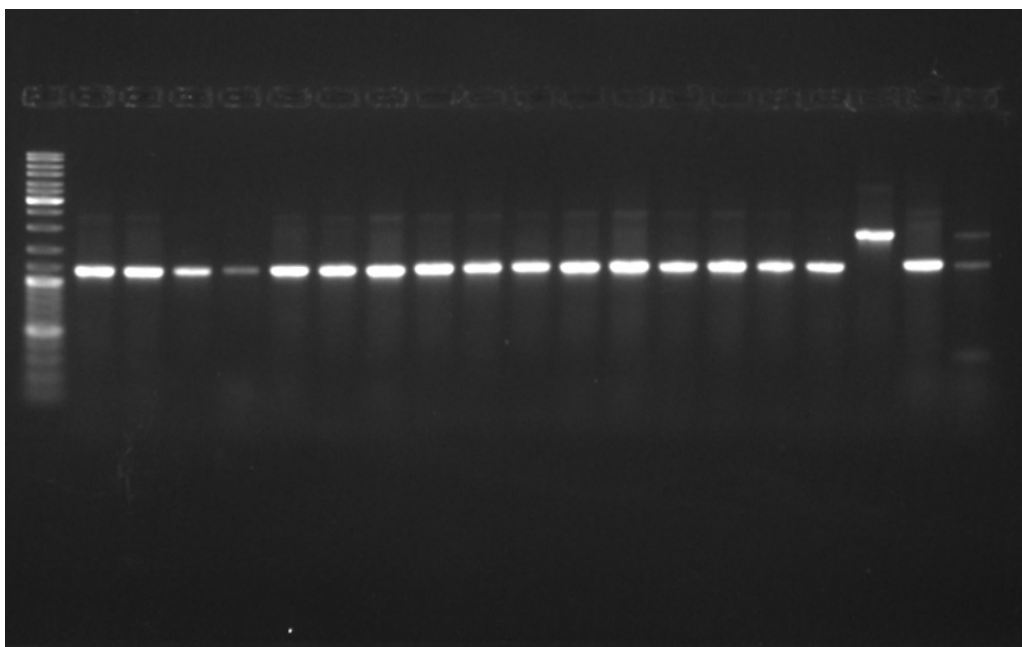


Fig. 6 – Exemplo da imagem obtida por análise de um gel de agarose, evidenciando a banda resultante da aplicação da técnica de ITS-PCR.

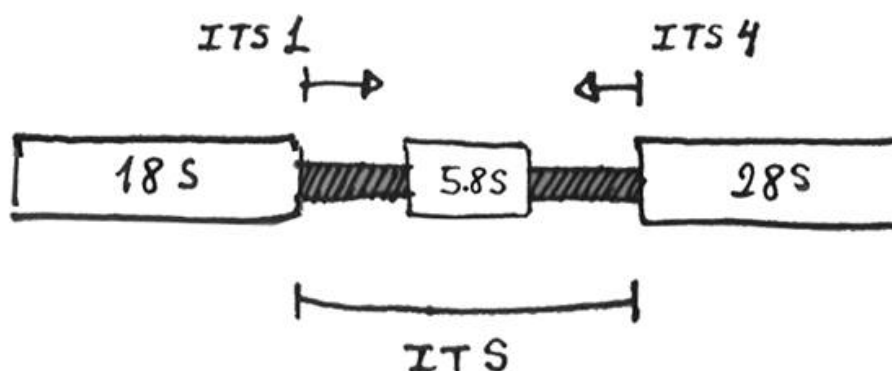


Fig. 7 – Esquema da posição dos “primers” ITS1 e ITS4.



Uma vez obtidas as sequências da região ITS procedeu-se à sua comparação com sequências de estirpes depositadas na base de dados GenBank permitindo desta forma a sua afiliação filogenética. Os resultados obtidos relativamente à comunidade endofítica das raízes, caules e folhas encontram-se expressos nas tabelas I, II e III, respetivamente. Para cada amostra é apresentado o nome da espécie (e estirpe) mais estreitamente relacionada, o hospedeiro a partir do qual essa estirpe foi isolada (quando mencionado pelo(s) autor(es)), a referência com que se encontra depositada no GenBank e a identidade máxima (extensão em que duas sequências de nucleótidos possuem os mesmos resíduos nas mesmas posições num alinhamento, expressa em percentagem).

Tabela I – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de raízes de *Halimione portulacoides*.

Isolado	Afiliação filogenética	Hospedeiro / fonte	Referência GenBank	Máxima identidade
R4	<i>Arthrinium kogelbergense</i> CBS 117206	alga desconhecida	KF144895	100%
R5	<i>Embellisia phragmospora</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i> ecad muscoides	JQ796758	99%
R8	<i>Fusarium</i> sp. AL-16 IRH-2012c	<i>Citrus limonum</i> var. Eureka	KC341961	99%
R9	<i>Arthrinium kogelbergense</i> CBS 117206	alga desconhecida	KF144895	99%
R10	<i>Alternaria limaciformis</i> CBS 481.81	Solo	KC584203	100%
R11	<i>Arthrinium arundinis</i> CBS 732.71	Estrume	KF144889	99%
R13	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	98%
R16	<i>Dendryphiella salina</i> CBS 142.60	<i>Spartina</i> sp. (caule)	DQ411540	100%
R19	<i>Halophytophthora</i> sp. EMTD10	folhada de sapal, em decomposição	JX910917	90%
R20	Fungal sp. MT0830	<i>Fraxinus excelsior</i>	HQ414611	99%
	<i>Gibberella pulicaris</i> SGSGf01	<i>Taxus globosa</i>	EU715637	99%
R22	<i>Phytophthora humicola</i> B033	Solo na proximidade de <i>Pinus pinea</i>	JQ757060	99%
	<i>Phytophthora inundata</i> ATCC MYA-4167	<i>Salix matsudana</i>	FJ196752	99%
R23	<i>Phytophthora humicola</i> B033	Solo na proximidade de <i>Pinus pinea</i>	JQ757060	99%
	<i>Phytophthora inundata</i> ATCC MYA-4167	<i>Salix matsudana</i>	FJ196752	99%
R24	<i>Fusarium incarnatum</i> DHMJ27		JN986779	100%
R26	<i>Fusarium incarnatum</i> DHMJ27		JN986779	100%
R27	<i>Sarocladium strictum</i> SC1107_03		KC311519	99%
R29	<i>Fusarium</i> sp. TA26-30	<i>Actinaria</i> sp.	JF819150	100%
R30	<i>Coniothyrium sporulosum</i> 58/2.4	<i>Sarcocornia fruticosa</i>	DQ865113	95%
R32	<i>Leptosphaeria contecta</i>		AF181702	99%
R33	<i>Decorospora gaudefroyi</i>		AF394541	99%

Tabela II – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de caules de *Halimione portulacoides*.

Isolado	Afiliação filogenética	Hospedeiro / fonte	Referência GenBank	Máxima identidade
C1	<i>Alternaria</i> sp. FppMV16	Solo de um vulcão de lama	HQ647309	100%
	<i>Embellisia phragmospora</i> EGS 27-098		FJ357314	99%
C2	<i>Embellisia phragmospora</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>ecad muscoides</i>	JQ796758	99%
C3	<i>Neofusicoccum australe</i> PDD 95990	<i>Carmichaelia stevensonii</i>	JQ694120	100%
C10	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	95%
C12	<i>Neofusicoccum australe</i> PDD 95990	<i>Carmichaelia stevensonii</i>	JQ694120	100%
C13	<i>Nigrospora oryzae</i> 2682	<i>Espeletia</i> sp.	EU272486	100%
C15	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	98%
C16	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	95%
C17	<i>Embellisia</i> sp. 9151S6	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>ecad scorioides</i>	JQ796753	100%
	<i>Embellisia phragmospora</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>ecad muscoides</i>	JQ796758	99%
C20	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	96%
C21	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	97%
C22	<i>Phoma betae</i> Sal54	<i>Salicornia bigelovii</i>	JX292134	100%
	<i>Ascochyta obiones</i> CBS 432.77	<i>Halimione portulacoides</i>	GU230752	100%
C26	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	97%
C30	Pleosporales sp. CWG-F3-E6		JF690988	93%
	<i>Septoria arundinacea</i> BJDC11	<i>Dracaena</i> sp.	GU361970	91%
C37	Pleosporales sp. CWG-F3-E6		JF690988	93%
	<i>Septoria arundinacea</i> BJDC11	<i>Dracaena</i> sp.	GU361970	91%
C41	<i>Phaeosphaeria</i> sp. ANT03-009		JX171188	90%
	<i>Pringsheimia euphorbiae</i> CBS 747.71	<i>Euphorbia rigida</i>	AJ244276	90%

Tabela III – Afiliação filogenética das sequências da região ITS obtidas da comunidade endofítica de folhas de *Halimione portulacoides*.

Isolado	Afiliação filogenética	Hospedeiro / fonte	Referência GenBank	Máxima identidade
ER1	<i>Phoma betae</i> Sal54	<i>Salicornia bigelovii</i>	JX292134	100%
	<i>Ascochyta obiones</i> CBS 432.77	<i>Halimione portulacoides</i>	GU230752	100%
F1	<i>Neofusicoccum australe</i> PDD 95990	<i>Carmichaelia stevensonii</i>	JQ694120	100%
F3	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	97%
F8	<i>Penicillium canescens</i> Cs/6/3		JN585940	100%
F9	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	95%
F11	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	98%
F14	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	97%
F15	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	98%
F16	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	95%
F20	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	98%
F22	Pleosporales sp. AH-1	<i>Artemisia halodendron</i>	KC460798	96%
F25	<i>Phytophthora polymorphica</i> CBS 680.84		AY598669	94%
F35	Pezizomycetes sp. AK0764	<i>Dactylina arctica</i>	JQ759165	99%
F37	Fungal endophyte sp. ICMP 15991	<i>Dacrydium cupressinum</i>	EU482263	99%
F38	Pleosporales sp. CWG-F3-E6		JF690988	93%
	<i>Septoria arundinacea</i> BJDC11	<i>Dracaena</i> sp.	GU361970	91%
F39	Pleosporales sp. CWG-F3-E6		JF690988	93%
	<i>Septoria arundinacea</i> BJDC11	<i>Dracaena</i> sp.	GU361970	91%

A análise destes resultados permite evidenciar que, na totalidade dos isolados obtidos, em termos taxonômicos, podemos diferenciar exemplares de dois Filos distintos: Ascomycota e Oomycota. Nesse sentido, considerou-se útil a construção de duas árvores filogenéticas diferentes, como a seguir se apresentam (figuras 8 e 9). A relação filogenética dos isolados endofíticos relativamente a outras espécies foi avaliada com recurso a software de análise filogenética adequado, nomeadamente MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

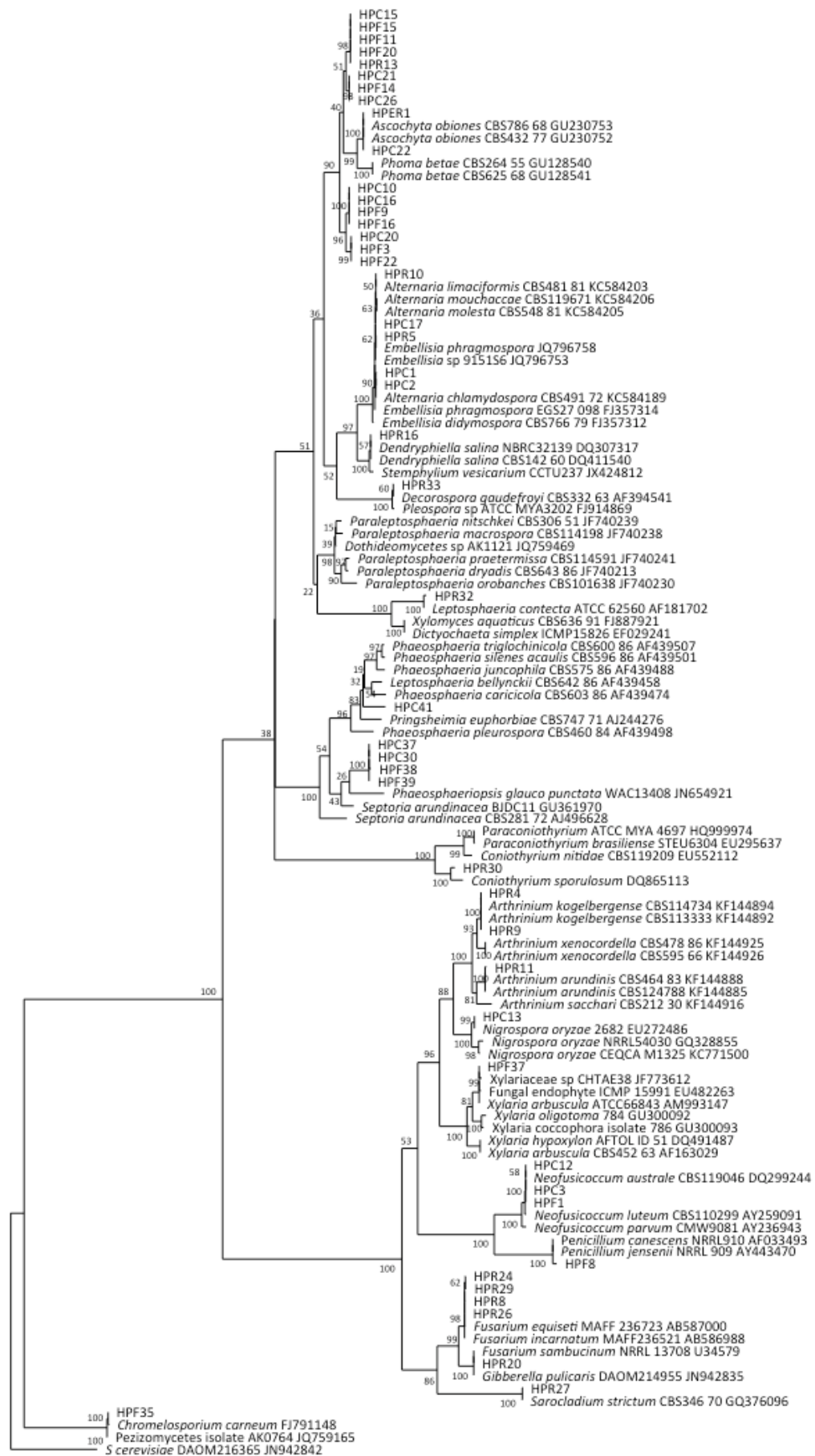


Fig. 8 – Relações filogenéticas dos isolados pertencentes ao grupo dos ascomicetos. A análise foi realizada utilizando o método Maximum Likelihood. Foi aplicado o modelo de evolução de DNA General Time Reversible (GTR) utilizando uma distribuição gama e permitindo locais invariáveis. São apresentados os valores de bootstrap (%) resultantes da realização de 1000 réplicas.

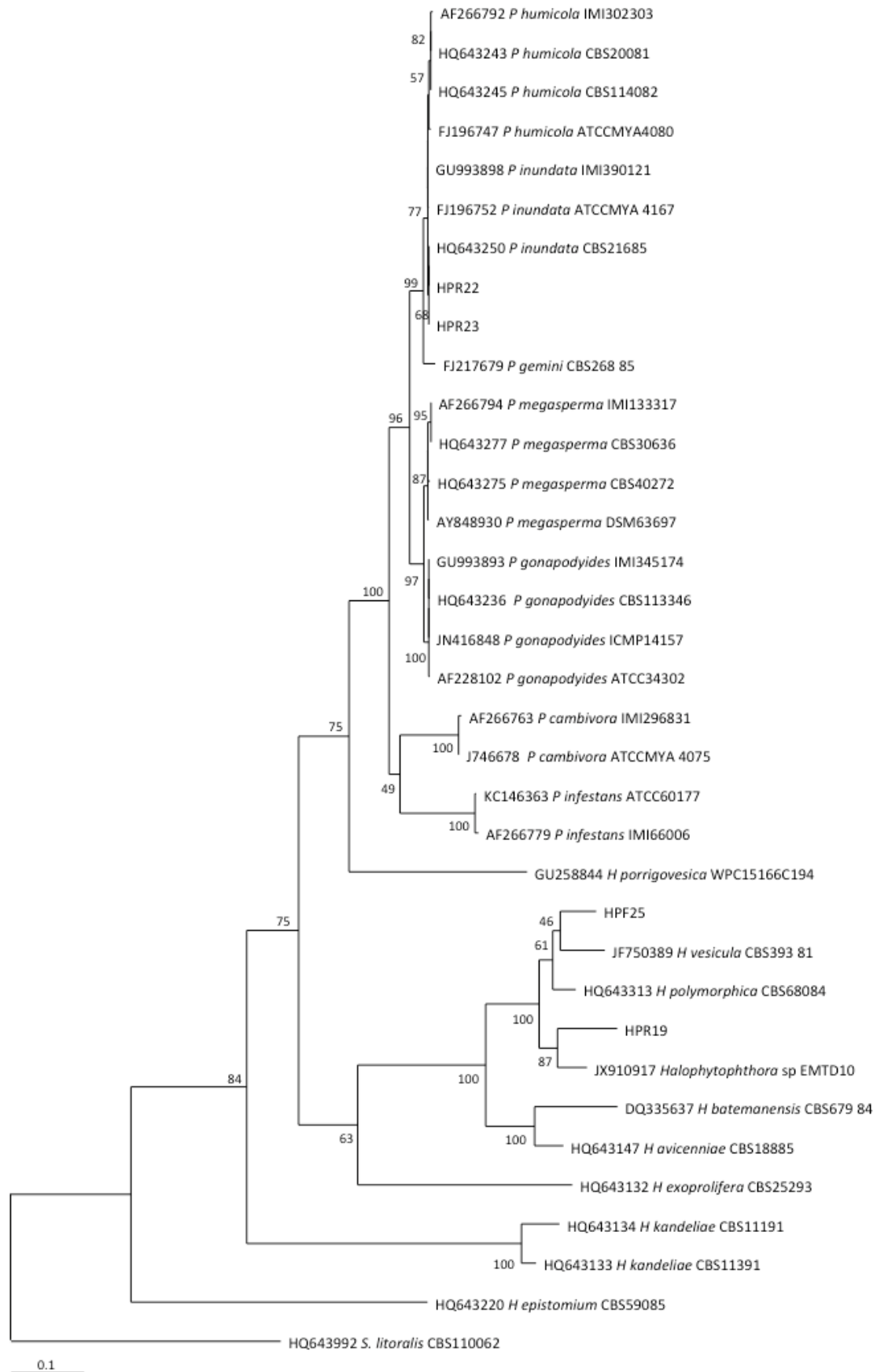


Fig. 9 – Relações filogenéticas dos isolados pertencentes ao grupo dos oomicetos. A análise foi realizada utilizando o método Maximum Likelihood. Foi aplicado o modelo de evolução de DNA General Time Reversible (GTR) utilizando uma distribuição gama e permitindo locais invariáveis. São apresentados os valores de bootstrap (%) resultantes da realização de 1000 réplicas.

O Filo Ascomycota faz parte do Reino Fungi (os “verdadeiros fungos”), e, juntamente com o Filo Basidiomycota, compõe o sub-Reino Dikarya (Hibbett *et al.* 2007). É reconhecido como o mais representativo, em termos de fungos endofíticos (Angelini *et al.*, 2012; Douanla-Meli e Langer 2012; Kusari *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2010; Sakayaroj *et al.*, 2010; U’Rens *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Embora alguns estudos tenham demonstrado também grande predominância de fungos endofíticos pertencentes ao grupo dos Basidiomycota (Angelini *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013), nenhum representante deste Filo foi encontrado no presente trabalho.

Os Oomycota são organismos semelhantes a fungos, mas muito distantes destes, filogeneticamente, estando mais próximos das algas castanhas e das diatomáceas (Robideau *et al.*, 2011). Originalmente, os Oomycota foram classificados como pertencendo ao Reino Fungi, mas atualmente fazem parte do Reino Straminipila (Bugni e Ireland, 2004; Robideau *et al.*, 2011). Esta redefinição taxonómica permite, assim, agrupar organismos que apresentam zoósporos biflagelados e em cujas paredes celulares se encontra celulose e hidroxiprolina, ao invés de quitina e prolina, como nos “verdadeiros fungos”. A relação destes organismos com ambientes aquáticos é essencial, pela presença dos zoósporos biflagelados. Richards *et al.* (2012) salientam o facto de muitos nichos ecológicos que, em ambiente terrestre ou de águas doces são ocupados por “verdadeiros fungos” são, em ambiente marinho, da responsabilidade dos Oomycota (estes autores referem-se, de forma particular, à capacidade saprófita destes organismos). Esta capacidade é ainda realçada em ecossistemas tipicamente costeiros por Bugni e Ireland (2004).

O cruzamento dos dados fornecidos pela análise do dendrograma de similaridade relativa à técnica de BOX-PCR com as árvores filogenéticas, permite indexar cada um dos 111 isolados a uma OTU (anexo 3), como se encontra resumido na tabela IV.

Tabela IV – Distribuição das OTUs identificadas, de acordo com as respetivas Ordens taxonómicas.

OTUs	Quantidade isolados	Total	Ordem
<i>Alternaria</i> sp.	7		
<i>Ascochyta obiones</i>	3		
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	1		
<i>Decorospora gaudefroyi</i>	3		
<i>Dendryphiella salina</i>	1		
<i>Leptosphaeria contecta</i>	2	70	Pleosporales
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	3		
Pleosporales sp. I	13		
Pleosporales sp. II	10		
Pleosporales sp. III	7		
Pleosporales sp. IV	11		
Pleosporales sp. V	9		
<i>Arthrinium arundinis</i>	1		
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	2	4	Xylariales
<i>Xylaria</i> sp.	1		
<i>Fusarium incarnatum</i>	11		
<i>Gibberella pulicaris</i>	1	14	Hypocreales
<i>Sarocladium strictum</i>	2		
<i>Neofusicoccum australe</i>	3	3	Botryosphaeriales
<i>Nigrospora oryzae</i>	1	1	Trichosphaeriales
<i>Penicillium</i> sp.	1	1	Eurotiales
Pezizomycetes sp.	1	1	Pezizales
<b>Total Ascomycota</b>		<b>94</b>	
<i>Halophytophthora</i> sp.	3		
<i>Halophytophthora polymorphica</i>	12	15	Pythiales
<i>Phytophthora humicola</i> / <i>inundata</i>	2		
<b>Total Oomycota</b>		<b>17</b>	
<b>Total isolados</b>		<b>111</b>	



Dos isolados obtidos, 84,7% correspondem ao Filo Ascomycota, sendo que, desses, 74,5% pertencem à Ordem Pleosporales (figura 10). Esta ordem, além de ser a mais representada em termos de indivíduos, é também a que apresenta maior diversidade de OTUs. Tal como já foi referido anteriormente, estes resultados estão de acordo com a generalidade das investigações realizadas, que apontam o Filo Ascomycota como o mais representativo em termos de fungos endofíticos. (Angelini *et al.*, 2012; Douanla-Meli e Langer 2012; Kusari *et al.*, 2013; Sakayaroj *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2010; U'Rens *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). No entanto, não será tão consensual a predominância relativamente à Ordem Pleosporales em trabalhos publicados: Angelini *et al.* (2012), em estudos com juncos do Lago Trasimeno, em Itália e Sakayaroj *et al.*, (2010), em halófitas da Tailândia identificaram grande número de exemplares da Ordem Hypocreales; a Ordem Xylariales predomina em estudos realizados, quer por Douanla-Meli e Langer (2012), em plantas africanas endémicas, quer por Thomas *et al.* (2008), em árvores do Equador; em dicotiledóneas da Antártida, são mais abundantes os fungos da Ordem Capnodiales (Rosa *et al.*, 2010), mas em briófitas do mesmo habitat é mais significativa a Ordem Helotiales (Zhang *et al.*, 2013); a Ordem Pezizales inclui a maior parte dos fungos isolados por U'ren *et al.* (2010) em musgos e líquenes da Floresta Nacional do Coronado, nos Estados Unidos da América; em estudos com a planta *Cannabis sativa*, Kusari *et al.* (2013) isolaram principalmente fungos da Ordem Eurotiales. Os exemplos atrás mencionados, embora representem uma amostra demasiado diminuta de estudos publicados neste universo de investigação, realçam a enorme heterogeneidade de comunidades de fungos endofíticos, quer associadas a diferentes ecossistemas, quer a diferentes hospedeiros.

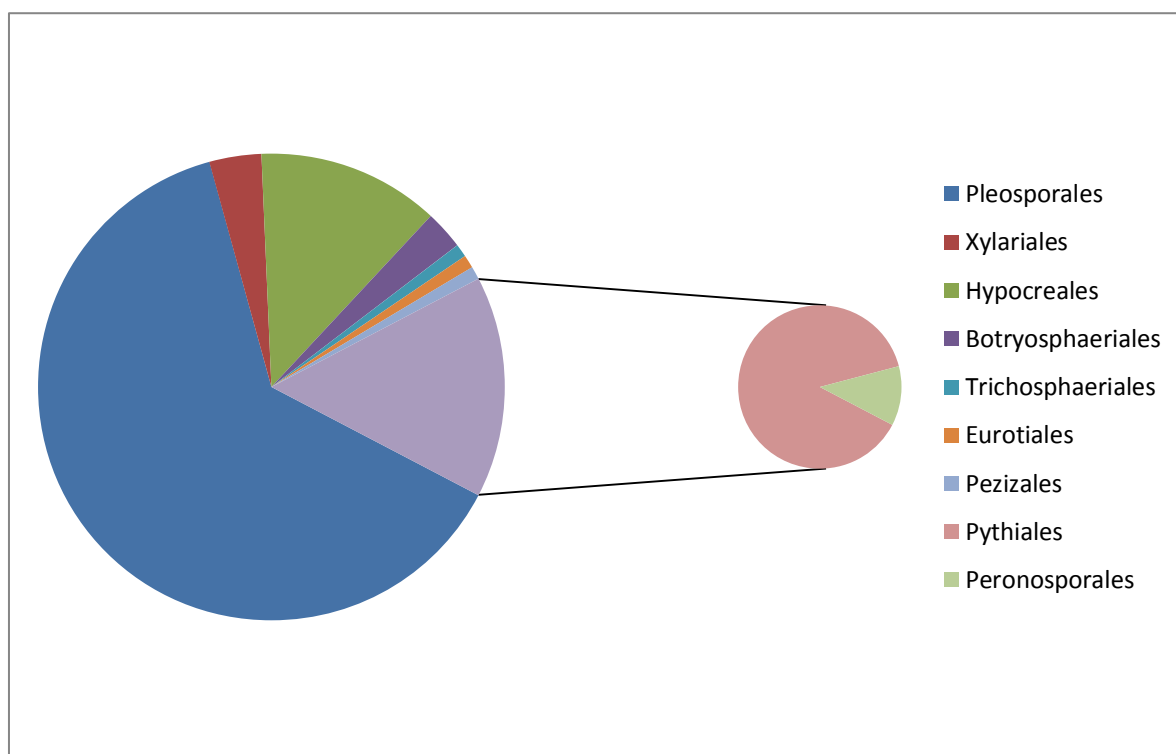


Fig. 10 – Representação gráfica da proporção de cada Ordem.

Correspondendo cada OTU ao local de recolha (Figuras 11 e 12) verificamos que as diferentes comunidades são bastante heterogéneas: das 25 OTUs isoladas neste trabalho, apenas uma (*Fusarium incarnatum*) é comum aos três locais; 21 OTUs surgem apenas num dos locais selecionados.

O Género *Fusarium* é dos que tem maior abundância de distribuição em plantas (Angelini *et al.*, 2012), incluindo halófitas (Maciá-Vicente *et al.*, 2008; Young-Hyun *et al.*, 2012), o que é concordante com os resultados obtidos no presente trabalho e com os estudos publicados por Dickinson e Pugh (1965a). Este Género está muitas vezes associado a sintomas de doença nas plantas (Choi *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2010), mas inclui também espécies com capacidade de produção de fitohormonas do grupo das giberelinas (Young-Hyun *et al.*, 2012) sendo portanto, considerados organismos promotores de crescimento (PGPs – “plant growth promoters”). Segundo os resultados publicados por Young-Hyun e seus colaboradores (2012), outros Géneros identificados em *Halimione portulacoides* podem ser associados a este efeito de promoção do crescimento de plantas que vivem em condições de stress salino: *Phaeosphaeria* e *Penicillium*.

Estudos de Elmer e Marra (2011) demonstram a relativa capacidade patogénica de *Fusarium incarnatum* em plantas de sapal. O facto de, no presente estudo, esta espécie surgir em plantas dos três locais amostrados, escolhidas pelo seu aspeto aparentemente saudável, reforça a ideia generalizada de que muitos fungos endofíticos são, na verdade, patogénicos latentes, à espera de uma situação debilitante do seu hospedeiro para, nessas condições, revelar as suas capacidades mais agressivas. Por outro lado, estes resultados corroboram os previamente apresentados por Elmer e Marra (2011), que consideraram esta espécie patogénica, mas não tanto como outras do mesmo Género.

Indivíduos dos Géneros *Fusarium* e *Phaeosphaeria* foram também isolados de dicotiledóneas da região Antártica (Rosa *et al.*, 2010). Este facto, por si só, é revelador da grande capacidade que diversos fungos endofíticos têm de colonizarem plantas de habitats extraordinariamente diferentes entre si.

Por outro lado, os resultados obtidos justificam a importância de estudar estas comunidades endofíticas como fonte alternativa de metabolitos importantes: alguns dos elementos identificados, como pertencentes aos Géneros *Fusarium* e *Alternaria* produzem paclitaxel, substância com propriedades anticancerígenas e que, durante muito tempo, se pensou ser produzida apenas pelas árvores do Género *Taxus* (Caruso *et al.*, 2000; Soca-Chafre *et al.*, 2011; Strobel *et al.*, 1996). Descobrir exemplares destas unidades taxonómicas em

plantas da Ria de Aveiro, pode constituir uma oportunidade de aproveitamento biotecnológico deste ecossistema específico.

Douanla-Meli e Langer (2012), assim como Osono *et al.* (2013) e Rajulu *et al.* (2013) referem que vários Géneros da Ordem Xylariales estão frequentemente associados a matéria vegetal em decomposição numa ampla gama de hospedeiros. A sua presença em *H. portulacoides* de aspeto saudável corrobora a ideia de que alguns fungos endofíticos têm um papel oportunista de saprófitos, tornando-se particularmente ativos aquando da senescência dos tecidos colonizados. Munidos da capacidade enzimática de degradar matéria vegetal em decomposição, estes indivíduos revelam-se mais competitivos do que outras espécies saprófitas que invadem tecidos já depois de iniciado o processo senescente.

Pertencendo a esta Ordem, duas das OTUs identificadas durante este trabalho fazem parte do Género *Arthrinium*, comum numa grande variedade de substratos e com importantes aplicações na indústria farmacêutica (Crous e Groenewald, 2013). Ecologicamente, indivíduos deste Género ocupam diversos nichos ecológicos, numa dualidade entre saprófitos e patogénicos, com hospedeiros tão diversos como plantas, líquenes e algas marinhas. Segundo Crous e Groenewald (2013) isolados deste género produzem substâncias importantes para o ser humano, com propriedades anticancerígenas ou antimicrobianas e também substâncias promotoras de crescimento de plantas. Duas espécies encontradas em *H. portulacoides* são particularmente referidas neste recente trabalho de reavaliação do Género *Arthrinium*: *A. kogelbergense*, descrita pela primeira vez por estes autores e *A. arundinis*, identificada como causadora de doenças em plantas de cevada.

No local A obtiveram-se 61 isolados, pertencentes a 13 OTUs; no local B obtiveram-se 27 isolados, pertencentes a 7 OTUs; no local E obtiveram-se 23 isolados, pertencentes a 10 OTUs. Apesar de, em termos de diversidade de OTUs, os três locais apresentarem valores bastante concordantes, verifica-se que é notoriamente superior a quantidade de isolados provenientes do local A. Este facto poderá estar associado a várias premissas: por um lado, as comunidades endofíticas dos locais B e E poderão ser constituídas por um maior número de espécies de crescimento lento e/ou não cultiváveis. Paralelamente, esta constatação pode ser reveladora da influência de diversos fatores ambientais na constituição destas mesmas comunidades, uma vez que ao local com maior quantidade de indivíduos corresponde uma maior diversidade biótica (é notória a existência de diversas árvores em redor do local de recolha) e uma presença de contaminação por metais menos evidente, como explicado anteriormente, na introdução.

Todos os isolados que pertencem ao Filo Oomycota foram encontrados apenas no local B. Diversos estudos referidos por Shearer *et al.* (2007) associam estes organismos a ecossistemas de zonas temperadas a tropicais, sendo praticamente ausentes em climas frios. O facto de, no presente estudo, apenas surgirem no local onde é maior a concentração de mercúrio, pode ser indicador da necessidade de conhecer melhor as relações bióticas deste ecossistema específico, procurando perceber se a associação destes organismos com a *Halimione portulacoides* tem influência na adaptação desta planta ao stress a que está sujeita ou se, pelo contrário, estão presentes numa atitude de patogénico oportunista, invadindo hospedeiros debilitados por stress ambiental. Na verdade, várias espécies deste mesmo Filo, nomeadamente as pertencentes ao género *Phytophthora*, identificado neste trabalho, estão descritas como incluindo agentes patogénicos de plantas (Robideau *et al.*, 2011). A espécie *Phytophthora inundata* é descrita como sendo parasita, podendo esporadicamente provocar doenças graves, quando se encontra num hospedeiro mais vulnerável (Brasier *et al.*, 2003).

Membros do Género *Halophytophthora* são frequentemente encontrados em folhas recém-caídas, em mangais, revelando a sua afinidade para ecossistemas onde a variação de salinidade é um fator preponderante (Jones, 2000; Nakagiri, 2000). Nesses habitats, desempenham um papel fundamental, decompondo matéria vegetal e libertando, deste modo, diversos nutrientes para o sistema (Nakagiri, 2000).

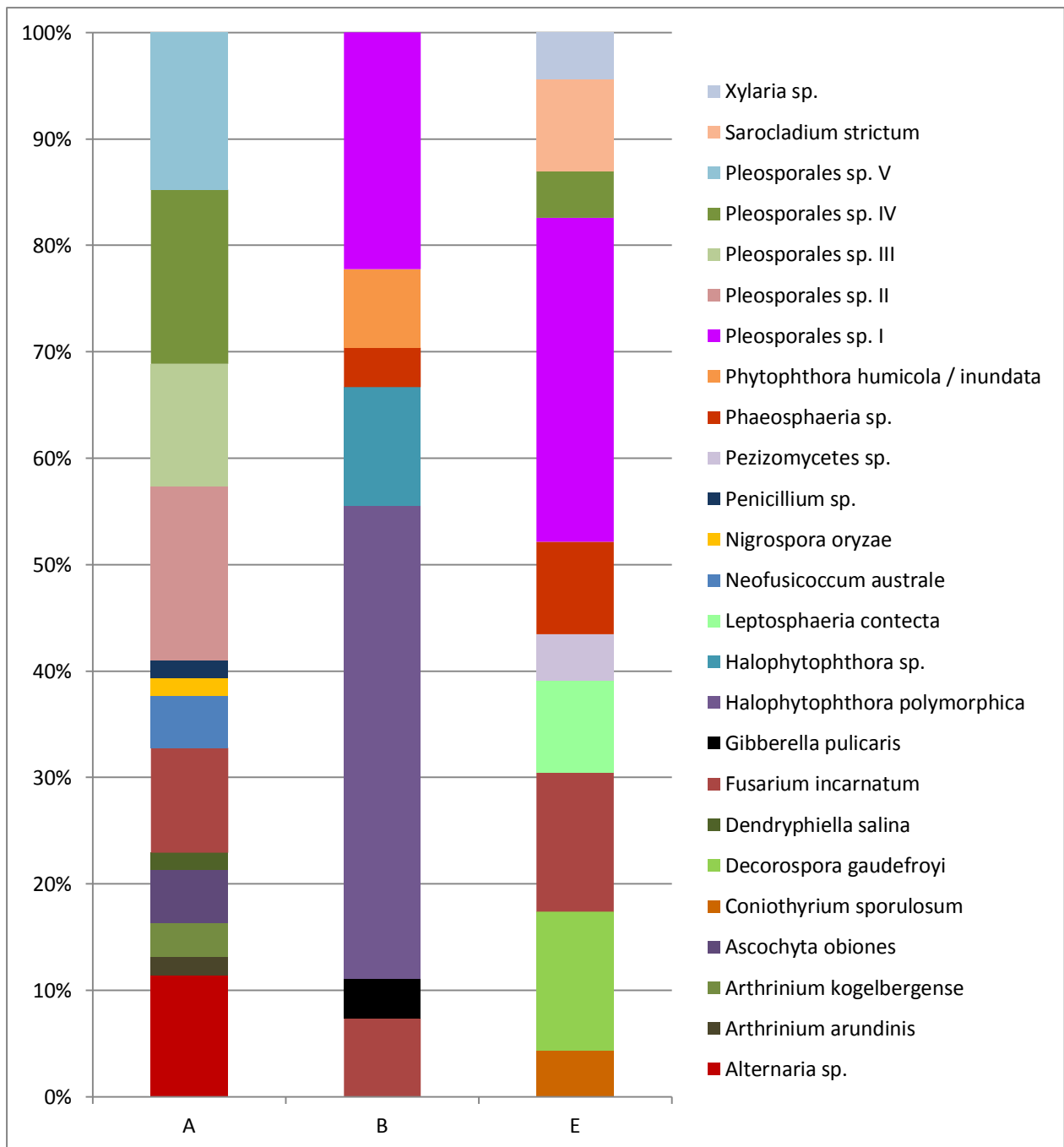


Fig. 11 – Proporção de OTUs da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três locais de amostragem distintos.

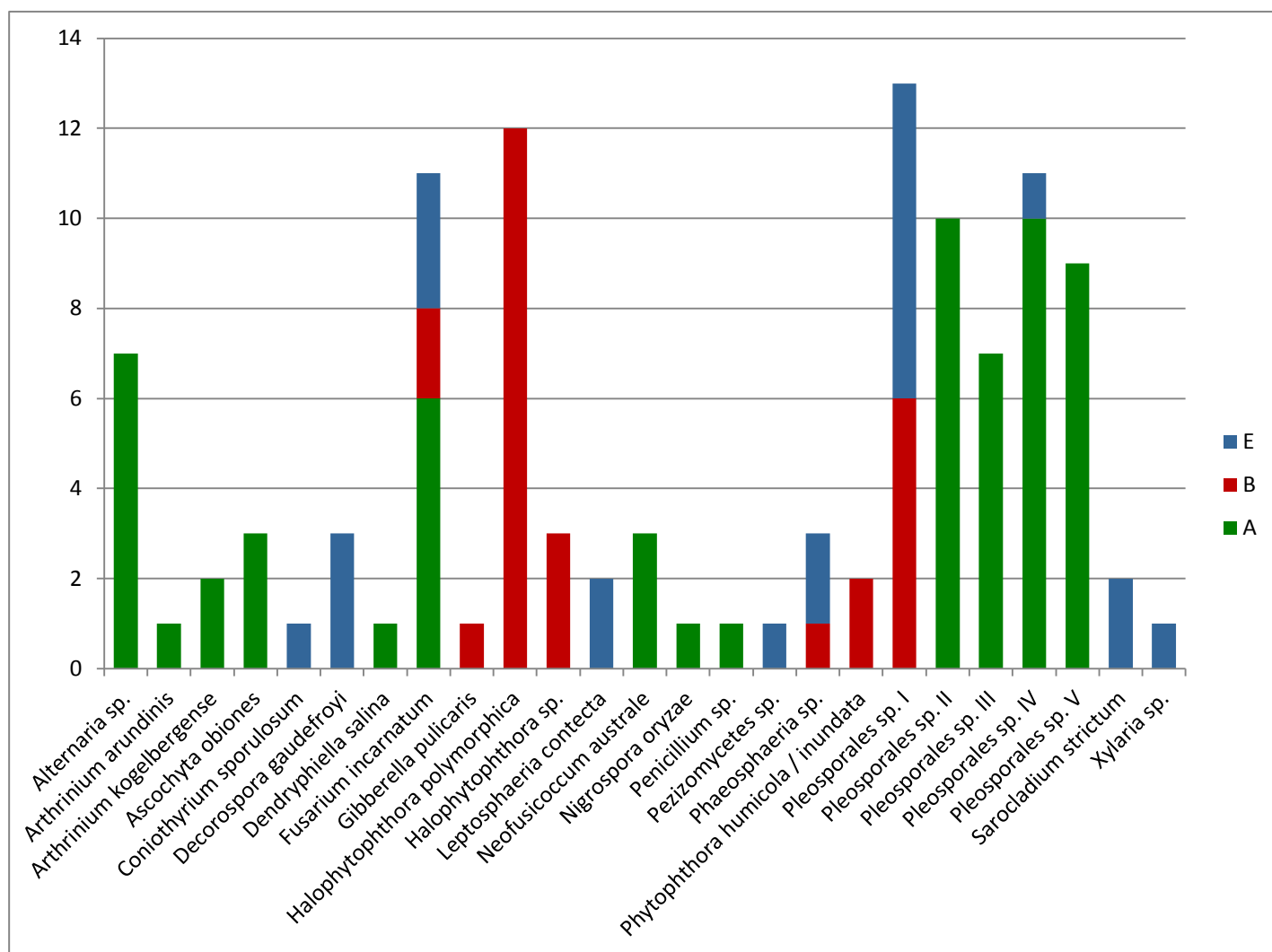


Fig. 12 – Quantificação de cada OTU da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três locais de amostragem distintos.

A caracterização da comunidade de fungos endofíticos de cada tecido (Figuras 13 e 14) revela valores que, em termos quantitativos, são muito homogêneos: 33 isolados da raiz, pertencendo a 13 OTUs diferentes (9 das quais só se encontram neste tecido), 40 isolados do caule, pertencendo a 12 OTUs (2 das quais exclusivas deste tecido); 38 isolados das folhas, de 11 OTUs (4 das quais surgem apenas nesta região da planta). É inegável a ubiquidade dos fungos, pois estes mostram-se capazes de colonizar os diversos tecidos vegetais. No entanto, verifica-se alguma especificidade ao nível das comunidades endofíticas de cada tecido colonizado, nomeadamente no que se refere à raiz. Esta situação não será alheia ao facto de ser precisamente a raiz a constituir o ambiente mais específico no que se refere à influência de diversos fatores abióticos (quantidade de luz disponível, assim como oxigenação ou constituintes da água circundante). Não obstante a referência de alguns estudos (Douanla-Meli e Langer 2012) para uma maior frequência de fungos nas folhas, os resultados obtidos estão

de acordo com alguns trabalhos que reconhecem as raízes como albergando comunidades endofíticas mais distintas dos restantes tecidos (Angelini *et al.*, 2012).

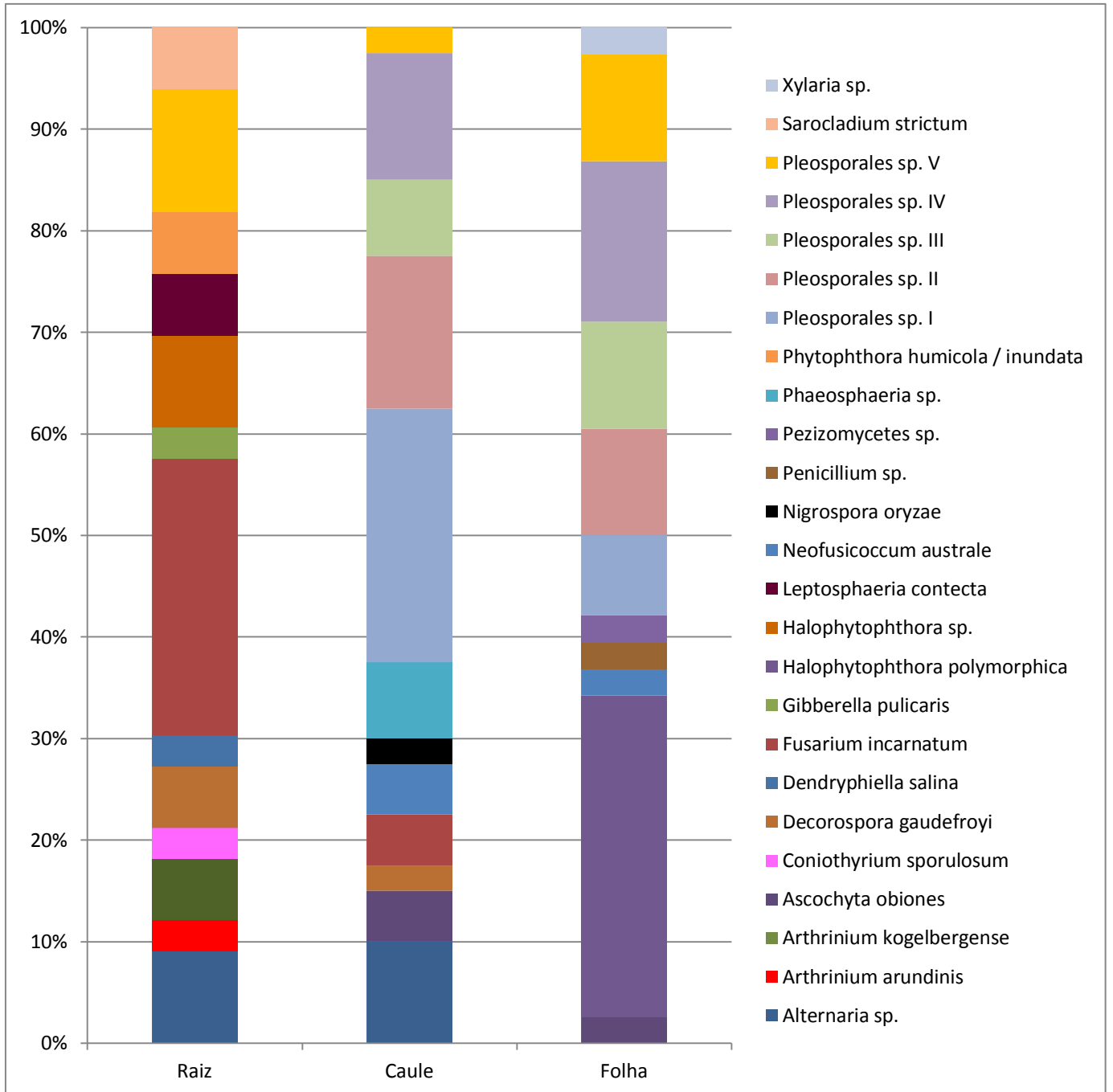


Fig. 13 – Proporção de OTUs da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três tecidos vegetais: raiz, caule e folhas.

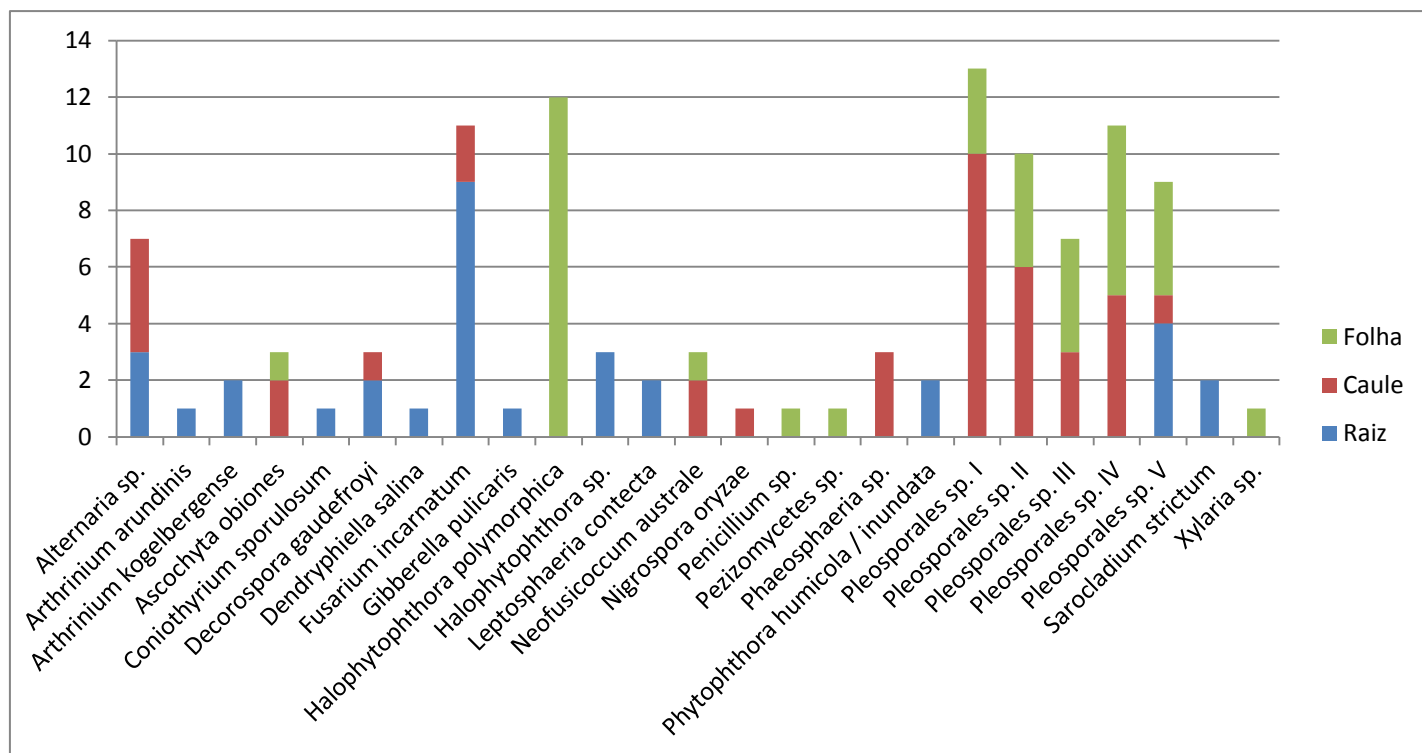


Fig. 14 – Quantificação de cada OTU da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* em três tecidos vegetais: raiz, caule e folhas.

Apenas os fungos pertencentes ao grupo dos Pleosporales sp. V são encontrados em todos os tecidos vegetais analisados. Esta circunstância poderá ser reveladora da existência de espécies de endofíticos com uma associação mais próxima com *Halimione portulacoides* do que outras mais cosmopolitas. É de salientar, igualmente, o facto de estas OTUs surgirem apenas no local de recolha A. A conjugação destes fatores remete-nos para a necessidade de intensificar os trabalhos de pesquisa e conhecimento da comunidade endofítica desta planta.

Nas folhas, a OTU mais abundante refere-se ao Género *Halophytophthora*, o que é concordante com estudos anteriormente publicados (Jones, 2000; Nakagiri, 2000), que os associam a este tecido.

O Género *Neofusicoccum* é típico de hospedeiros lenhosos (Slippers e Wingfield, 2007). A sua presença “inesperada” em *Halimione portulacoides* obtidas no local A revela a influência a que estas comunidades endofíticas estão sujeitas, relativamente a outros seres vivos do ecossistema. Tendo-se isolado esta espécie a partir de caules e folhas de *H. portulacoides* (ver figura 14), poder-se-á inferir acerca da colonização deste fungo, por via aérea, a partir de plantas lenhosas que ocorrem nas imediações do local de recolha.



Elementos do Género *Alternaria* foram já descritos como endofíticos de *Halimione portulacoides* (Dickinson, 1965). Contudo, enquanto que nesses estudos anteriormente publicados, a sua identificação ocorreu exclusivamente a partir de folhas, no presente trabalho todos os indivíduos foram recolhidos em raízes e caules, revelando a sua capacidade de invadir diferentes tecidos. Já o Género *Penicillium*, parece ter uma preferência pela colonização de folhas, uma vez que os resultados obtidos estão plenamente de acordo com os publicados por Dickinson (1965).

A Espécie *Ascochyta obiones* foi isolada a partir de fragmentos de caules e folhas, o que se assemelha bastante ao esperado, uma vez que, embora já tenha sido identificada em diferentes tecidos, é indicada por Dickinson e Pugh (1965a) como especialmente abundante em partes aéreas de *Halimione portulacoides* (Dickinson e Pugh, 1965a).

## 2. Análise de diversidade

A diversidade das comunidades de fungos endofíticos presentes em cada local e tecido foi estimada utilizando os índices de diversidade de Shannon, Simpson e Margalef. (Magurran, 2004). Os resultados encontram-se patentes na tabela V.

Tabela V – Índices de diversidade (R – raíz, C – caule, F – folha).

		Shannon	Equitatividade	Simpson	Margalef
Local	A	2,278	0,888	0,896	2,919
	B	1,569	0,806	0,755	1,820
	E	2,076	0,902	0,881	2,870
Tecido	R	2,319	0,904	0,900	3,432
	C	2,236	0,900	0,891	2,982
	F	2,045	0,853	0,855	2,749

A análise dos diversos índices permite confirmar os resultados apresentados anteriormente, referentes a uma menor diversidade no local B (figura 11) e nas folhas (figura 13).

Considerou-se igualmente útil avaliar a similaridade das comunidades entre os três locais e tecidos, através do cálculo dos índices de Jaccard, Sorensen e Bray-Curtis (Magurran, 2004).

Tabela VI – Índices de similaridade (R – raíz, C – caule, F – folha).

		Jaccard	Sorensen	Bray-Curtis
<b>Local</b>	AB	0,053	0,100	0,045
	AE	0,095	0,174	0,095
	BE	0,214	0,353	0,360
<b>Tecido</b>	RC	0,200	0,333	0,192
	RF	0,043	0,083	0,113
	CF	0,438	0,609	0,462

A análise da tabela VI permite concluir que as comunidades dos locais B e E são as mais semelhantes entre si. Este resultado era expectável, uma vez que estes dois locais, geograficamente muito próximos, são precisamente os que apresentam maior similaridade ao nível de diversos fatores, quer bióticos, quer abióticos, tais como a diminuta ocupação antrópica, as semelhanças ao nível das populações integrantes de cada ecossistema ou a influência de contaminação dos solos com mercúrio.

Ao nível tecidual verifica-se maior similaridade nas comunidades de caules e folhas. Estes resultados são igualmente expectáveis, tal como referido anteriormente, pois os tecidos referidos apresentam maior semelhança na influência de diversos fatores abióticos, como quantidade de luz disponível, níveis de oxigenação ou de humidade, em oposição às condições específicas a que as células radiculares estão expostas (Angelini *et al.*, 2012).

### 3. Caracterização fisiológica

A deteção de atividades enzimáticas extracelulares foi realizada após cultivo de cada isolado em placa de meio agarizado contendo substrato adequado para avaliação da capacidade dos fungos produzirem as enzimas necessárias à penetração e colonização da planta hospedeira. Considera-se que estas biomoléculas representam elevado potencial biotecnológico, podendo futuramente ser exploradas em termos industriais.

Testaram-se as seguintes atividades enzimáticas: atividade amilolítica, proteolítica, lipolítica, pectinolítica, de celulase, de xilanase, de urease e de lacase. Os ensaios realizados permitiram avaliar a produção de enzimas extracelulares pelo aparecimento de halos transparentes, ou alteração do meio de cultura, como produção de cor ou formação de precipitados (Hankin e Anagnostakis; 1975; St Leger *et al.*, 1997; Rigling, 1995). A figura 15 sistematiza os resultados obtidos, igualmente patentes na tabela VII (a globalidade dos resultados encontra-se nas tabelas XII, XIII e XIV, anexo 4).

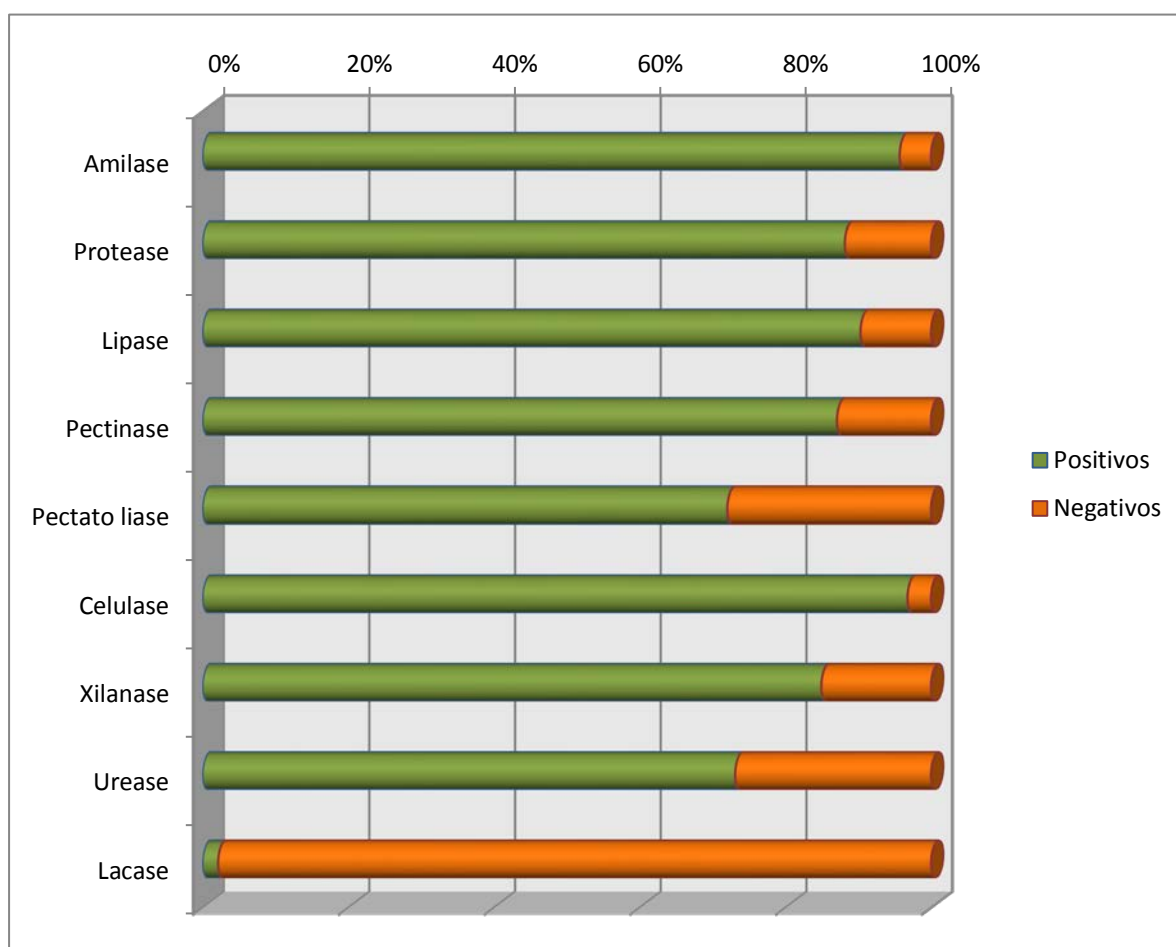


Fig. 15 – Resultado dos testes de determinação de atividade enzimática.

Tabela VII – Quantificação dos resultados positivos das diversas OTUs relativamente aos testes de determinação de atividade enzimática realizados.

Amostra	N. isolados total	N. isolados testados	Amilase	Protease	Lipase	Pectinase	Pectato liase	Celulase	Xilanase	Urease	Lacase
<i>Alternaria</i> sp.	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
<i>Arthrinium arundinis</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	2	2	2	2	1	1	1	2	2	0	0
<i>Ascochyta obiones</i>	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	0
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
<i>Decorospora gaudefroyi</i>	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	0
<i>Dendryphiella salina</i>	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
<i>Fusarium incarnatum</i> / <i>Gibberella pulicaris</i>	12	12	12	11	8	12	7	12	11	12	0
<i>Halophytophthora polymorphica</i>	12	12	12	10	12	6	2	10	8	10	0
<i>Halophytophthora</i> sp.	3	2	2	2	2	1	1	2	1	2	0
<i>Leptosphaeria contecta</i>	2	2	2	2	2	1	1	2	2	0	0
<i>Neofusicoccum australe</i>	3	3	3	2	3	1	1	3	1	0	1
<i>Nigrospora oryzae</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>Penicillium</i> sp.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>Pezizomycetes</i> sp.	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>Phytophthora humicola</i> / <i>inundata</i>	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Pleosporales</i> sp. I	13	8	8	8	8	8	8	8	8	0	0
<i>Pleosporales</i> sp. II	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	0
<i>Pleosporales</i> sp. III	7	6	6	6	6	6	4	6	5	6	0
<i>Pleosporales</i> sp. IV	11	11	10	10	11	11	10	10	10	10	0
<i>Pleosporales</i> sp. V	9	6	6	6	6	6	6	6	3	5	0
<i>Sarocladium strictum</i>	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	0
<i>Xylaria</i> sp.	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1

O amido é, indiscutivelmente, uma fonte de alimento por excelência para os seres vivos. Constitui reservas energéticas no mundo vegetal, pelo que se torna rapidamente disponível para os fungos endofíticos que vivam numa planta, aquando da morte desta (Choi *et al.*, 2005). Antes de qualquer outro decompositor, os fungos endofíticos têm, portanto, acesso primordial a esta fonte de matéria orgânica. Dos isolados analisados, 95,7% apresenta atividade amilolítica.

A análise dos resultados, patentes no gráfico da figura 15 permite verificar que 88,2% dos isolados testados apresentam atividade proteolítica, fundamental para o estabelecimento de uma relação ecológica com o hospedeiro (Reddy *et al.*, 1996). Segundo estes autores, determinadas proteases produzidas por fungos endofíticos são surpreendentemente abundantes em tecidos de plantas infetadas, sugerindo que estas enzimas representam um papel fundamental na interação entre o patogénico e o hospedeiro. Reconhecendo o impacto que as doenças das plantas têm em termos ecológicos e agrónomicos, considera-se fundamental aprofundar conhecimentos relativos aos fatores necessários para o estabelecimento da relação entre os fungos e as plantas. Outras proteases, contudo, são particularmente abundantes em fungos saprófitos e, desta forma, degradam proteínas de tecidos mortos, devolvendo os seus aminoácidos ao ecossistema. Outras ainda, são reconhecidamente importantes na degradação de proteínas da cutícula de insetos, pelo que se pode inferir acerca da capacidade de proteger a planta de herbivorismo (Reddy *et al.*, 1996). Por todas estas razões apresentadas se compreende que a identificação e o estudo das proteases produzidas por diversos fungos é uma peça fundamental para a compreensão do nicho ecológico ocupado pelos diversos fungos endofíticos identificados.

Em termos biotecnológicos, é ainda importante realçar que a quantidade de enzimas proteolíticas produzidas em todo o mundo, em termos comerciais, é largamente superior à produção de qualquer outra enzima (Antranikian *et al.*, 2005).

Sendo polissacáridos estruturais da parede celular do Reino vegetal, a celulose, o xilano e as pectinas são dos polímeros orgânicos mais abundantes na natureza. Possuir capacidade de digerir estas moléculas, através da ação de celulasas, xilanases, e pectinases, respetivamente, é fundamental para qualquer microrganismo que pretenda invadir os tecidos vegetais, pelo que se considerou pertinente a pesquisa deste tipo de atividade nos isolados obtidos. A atividade pectinolítica foi analisada através da incorporação de pectina em meios de cultura com dois valores diferentes de pH, uma vez que as exopectinases são normalmente mais ativas com pH 5,0, enquanto as endopectinases apresentam maior atividade com pH 7,0 (Loperena *et al.*, 2012). A análise dos resultados permite verificar que todos os isolados testados apresentam atividade de, pelo menos, uma destas enzimas (anexo 4), sendo a mais abundante a celulase, presente em 96,8% dos isolados. Segundo Choi *et al.* (2005), endofíticos

com a dupla capacidade de produzir celulasas e xilanasas tendem a ser mutualistas, enquanto que fungos capazes de degradar pectina tendem a ser patogénicos, mesmo que latentes.

Realizaram-se ainda ensaios no sentido de avaliar a presença de lacases, pertencentes a uma das famílias de enzimas responsáveis pela degradação primária dos polímeros de lenhina. O interesse científico relativo a este tipo de enzimas tem sido alimentado, não só pela sua participação na degradação da lenhina, mas também pelas suas potenciais utilizações em descontaminação de poluentes ambientais, na prevenção da descoloração do vinho ou no processamento de papel, entre outros (Lyons *et. al.*, 2003). Embora estes autores afirmem que a presença de lacases está muito difundida entre fungos de ecossistemas de sapal, apenas cerca de 2% dos isolados testados revelaram este tipo de atividade.

#### 4. Perspetivas futuras

Sabe-se que estes estudos não fornecem a visão global da comunidade de fungos endofíticos, pois alguns elementos não serão cultiváveis, por terem dificuldade de crescimento quando impedidos de estabelecer relações com outros organismos (quer o próprio hospedeiro, quer com outros elementos habitualmente pertencentes à mesma comunidade endofítica). Da mesma forma, o método utilizado pode criar uma ideia pouco correta da comunidade endofítica, ao negligenciar espécies que não crescem no meio de cultura utilizado ou o fazem muito lentamente, enquanto as espécies que crescem bem em cultura ficam sobre representadas. Este risco existe, de facto, mas ainda assim pode considerar-se mínimo, atendendo ao facto de se saber, através de diversos estudos, que a esmagadora maioria dos fungos é, de facto, cultivável através do método escolhido (Porras-Alfaro e Bayman, 2011). A abordagem alternativa, que poderia complementar este estudo, seria através de estudos de PCR ambiental, baseados na amplificação direta do DNA dos tecidos vegetais. Trabalhos posteriores deverão, portanto, incidir numa abordagem metagenómica para detetar fungos que não crescem de forma convencional. Segundo Antranikian *et al.* (2005), apenas cerca de 1% a 3% dos microrganismos viáveis numa amostra são passíveis de ser recolhidos por técnicas de cultura. Embora esta constatação tenha em consideração quer os fungos quer as bactérias, depreende-se a extrapolação que se pode fazer especificamente para estudos que visem apenas a comunidade de fungos endofíticos.

A repetição mais exaustiva deste estudo seria importantíssima para clarificação dos isolados como endofíticos. Na verdade, “é a recorrência de uma espécie de microrganismo isolado que revela o seu verdadeiro estado endofítico” (Azevedo *et al.*, 1998), uma vez que se corre o risco de isolar inadvertidamente alguns epifíticos. Por outro lado, o presente estudo não conseguiu, por limitações temporais, representar hipotéticas variações sazonais que a comunidade endofítica possa revelar dentro da mesma planta, nem variações ao longo do ciclo de vida do hospedeiro.

Paralelamente, considera-se importante a realização de mais estudos fisiológicos, nomeadamente de produção de substâncias antimicrobianas, de luta contra herbivorismo e com potencial na promoção do crescimento das plantas hospedeiras. Segundo Strobel e Daisy (2003), devem ser melhor compreendidos os mecanismos através dos quais os endófitos interagem com o hospedeiro e respondem às alterações do seu ambiente, de forma a otimizar processos de investigação de novos metabolitos secundários com interesse para o ser humano. Por outro lado, a intensificação deste tipo de estudos permitirá compreender melhor a vasta gama de fatores necessários ao estabelecimento de interações efetivas entre fungos e hospedeiros, podendo este conhecimento ser útil nos esforços para gerar novas combinações entre plantas e endofíticos, com melhores características agronómicas (Reddy *et al.*, 1996)

Tendo em conta que 48% das OTUs identificadas correspondem a isolados provenientes apenas de plantas do Largo do Laranjo (figura 12) e aceitando que estes locais de recolha (locais B e E, figura 2) apresentam elevados níveis de contaminação por mercúrio (Pereira *et al.*, 2009; Válega *et al.*, 2009), reconhece-se a importância de estudos futuros no sentido de avaliar a tolerância destes isolados fúngicos a diversos metais, em particular, precisamente, o mercúrio.

Da análise da tabela IV sobressai o facto de grande parte dos isolados não serem passíveis de identificação ao nível de espécie. A identificação de 45% dos isolados, inclusivamente, não permitiu, sequer, reconhecer o Género. Estes isolados poderão, na verdade, representar espécies novas, ainda não descritas pela comunidade científica, pelo que carecem de mais estudos avaliativos.





## Bibliografia

- Alves, A., Phillips, A.J.L., Henriques, I. e Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*. **158**: 112-121.
- Angelini, P., Rubini, A., Gigante, D., Reale, L., Pagiotti, R. e Venanzoni, R. (2012). The endophytic fungal communities associated with the leaves and roots of the common reed (*Phragmites australis*) in Lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. *Fungal Ecology*. 5: 683-693.
- Antranikian, G., Vorgias C.E. e Bertoldo C. (2005). Extreme Environments as a Resource for Microorganisms and Novel Biocatalysts. *Marine Biotechnology*. **96**: 219-262.
- Azevedo, J.L., Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 117-137.
- Bacon, C.W., Glenn, A.E. e Hinton, D.M. (2002). Isolation, in planta detection, and culture of endophytic bacteria and fungi. Em: C.J. Hurst, G R. Knudsen, M.J. McInerney (2ª Eds.), *Manual of environmental microbiology*, ASM Press. Washington.
- Brasier, C.M., Sanchez-Hernandez, E. e Kirk, S.A. (2003). *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research*. **107**: 477–484.
- Bugni, T.S. e Ireland, C.M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*. **21**: 143-163.
- Caruso, M., Colombo, A.L., Crespi-Perellino, N., Fedeli, L., Malyszko, J., Pavesi, A., Quaroni, S., Saracchi, M., Ventrella, G. (2000). Studies on a strain of *Kitasatospora* sp. paclitaxel producer. *Annals of Microbiology*. **50**: 89-102.
- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J. e Hyde, K.D. (2005). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. **1**: 55-66.

- Coelho, J.P., Pereira, M.E., Duarte, A.C. e Pardal, M.A. (2009). Contribution of primary producers to mercury trophic transfer in estuarine ecosystems: Possible effects of eutrophication. *Marine Pollution Bulletin*. **58**: 358-365.
- Constanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., VanDenBelt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*. **387**: 253-260.
- Crous, P.W. e Groenewald, J.Z. (2013). A phylogenetic re-evaluation of *Arthrrium*. *IMA Fungus*. **4**: 133-154.
- Dickinson, C.H. (1965). The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. III. Fungi on green and moribund leaves. *Transactions of the British Mycological Society*. **48**: 603-610.
- Dickinson, C.H. e Pugh, J.F. (1965a). The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. I. The establishment of the root surface flora of mature plants. *Transactions of the British Mycological Society*. **48**: 381-390.
- Dickinson, C.H. e Pugh, J.F. (1965b). The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. II. Root surface fungi of mature and excised plants. *Transactions of the British Mycological Society*. **48**: 595-602.
- Dickinson, C.H. e Morgan-Jones, G. (1966). The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. IV. Observations on some species of Sphaeropsidales. *Transactions of the British Mycological Society*. **49**: 43-55.
- Douanla-Meli, C. e Langer, E. (2012). Diversity and molecular phylogeny of fungal endophytes associated with *Diospyros crassiflora*. *Mycology*. **3**: 175-187.
- Duarte, B., Silva, V., e Caçador, I. (2012). Hexavalent chromium reduction, uptake and oxidative biomarkers in *Halimione portulacoides*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **83**: 1-7.
- Elmer W.H. e Marra, R.E. (2011). New species of *Fusarium* associated with dieback of *Spartina alterniflora* in Atlantic salt marshes. *Mycology*. **103**: 806-819.
- Ferrari, C., Gerdol, R. e Piccoli, F. (1985). The halophilous vegetation of the Po Delta (northern Italy). *Vegetatio*. **61**: 5-14.

- Hankin, L. e Anagnostakis S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. **67**: 597-607.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lichtwardt R., Longcore, J., Miadlikwska, J., Miller, A., Moncalvo, J., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux C., Ryvariden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Unterreiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y. e Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. **111**: 509-547.
- Jones, E.B.G. (2000). Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Diversity*. **4**: 53-73.
- Kusari, S., Hertweck, C. e Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*. **19**: 792-798..
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M. e Kayser, O. (2013). Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*. **60**: 137-151
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson T.J. e Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics*. **23**: 2947-2948.
- Loperena, L., Soria, V., Varela, H., Lupo S., Bergalli, A., Guigou, M., Pellegrino, A., Bernardo, A., Calviño, A., Rivas, F.e Batista, S. (2012). Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **28**: 2249-2256.
- Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A. e Moran M.A. (2003). Diversity of Ascomycete Laccase Gene Sequences in a Southeastern US Salt Marsh. *Microbial Ecology*. **45**:270-281.

- Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H., Abdullah, S.K., Descals, E., Salinas, J. e Lopez-Llorca, L.V. (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. **64**: 90-105.
- Magurran, A. E. (2004), *Measuring Biological Diversity*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Möller, E.M., Bahnweg, G.H., Sandermann, e Geiger H.H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Reserach*. **20**: 6115-6116.
- Mousa, W.K. e Raizada, M.N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*. **4**: 1-18.
- Nakagiri, A. (2000). Ecology and biodiversity of *Halophytophthora* species. *Fungal Diversity*. **5**: 153-164.
- Neto, P.A.S.P., Azevedo, J.L. e Araújo, W.L. (2002). Microrganismos endofíticos – interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. **29**: 62-76.
- Nilsson RH, Kristiansson E, RybergM, Hallenberg N, Larsson K-H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary. Bioinformatics*. **4**: 193-201.
- Osono, T., Tateno, O. e Masuya, H. (2013). Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience*. **54**: 54-61.
- Pelaéz, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Matas, M.T.D., García, J.B., Del Val, A.G., González, V., Gorrochategui, J., Hernández, P., Martín, I., Platas, G. e Vicente, F. (1998). Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*. **102**: 755-761.
- Pereira, M.E., Lillebø, A.I., Pato, P., Válega, M., Coelho, J.P., Lopes, C.B., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M.A. e Duarte, A.C. (2009). Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*. **155**: 39-49.

- Porras-Alfaro, A. e Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*. **49**: 291-315.
- Priti, V., Ramesha B.T., Singh, S., Ravikanth, G., Ganeshaiah, K.N., Suryanarayanan, T.S. e Shaanker, R.U. (2009). How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? *Current Science*. **97**: 477-478.
- Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu, N., Babu, A.G., Aggarwal, A., Suryanarayanan, T.S. e Reddy, M.S. (2013). Endophytic Xylariaceae from the forests of Western Ghats, southern India: distribution and biological activities. *Mycology*. **4**: 29-37.
- Reddy, P.V, Lam C.K. e Belanger, F. C., (1996). Mutualistic Fungal Endophytes Express a Homologous to Proteases Suspected to Fungal Pathogenicity. *Plant Physiology*. **111**: 1209-1218.
- Richards, T.A., Jones, M.D.M., Leonard, G. e Bass, D. (2012). Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Annual Review of Marine Science*. **4**: 495-522.
- Rigling, D. (1995). Isolation and characterization of *Cryphonectria parasitica* mutants that mimic a sepcific effect of hypovirulence-associated dsRNA on laccase activity. *Canadian Journal of Botany*. **73**: 1655-1661.
- Robideau, G.P. De Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty,D.W., De Saulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B., e Lévesque, C.A. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 1002-1011.
- Rodriguez, R.J. e Redman, R.S. (1997). Fungal Life-styles and Ecosystem Dynamics: Biological Aspects of Plant Pathogens, Plant Endophytes and Saprophytes. *Advances in Botanical Research*. **24**: 169-193.
- Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Santiago, I.F. e Rosa, C.A. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. **73**: 178-189.

- Saikkonen, K., Faeth, H.S., Helander, M. e Sullivan, T.J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **29**: 319-343.
- Sakayaroj, J., Preedanon, S., Supaphon, O., Jones, E.B.G. e Phongpaichit, S. (2010). Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. *Fungal Diversity*. **42**: 27-45.
- Schulz B., Boyle, C., Draeger, S. , Römmert, A.K. e Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. **106** : 996-1004.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A. e Voglymayr, H. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*. **16**: 49-67.
- Slippers, B. e Wingfield, M.J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*. **21**: 90-106.
- Soca-Chafre, G., Rivera-Orduña, F.N., Hidalgo-Lara, M.E., Hernandez-Rodriguez, C., MARSCH, R. e Flores-Cotera, L.B. (2011). Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biology*. 115: 143-156.
- St Leger, R.J., Joshi, L. e Roberts, D.W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*. **143**: 1983-1992.
- Strobel, G.A., Hess, W.M., Ford, E., Sidhu, R.S., Yang, X. (1996). Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **17**: 417-423.
- Strobel, G. e Daisy B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**: 491–502.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**: 2731-2739.

- Thomas, S.E., Crozier, J., Aime, M.C., Evans, H.C., Holmes, K.A. (2008). Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycological Research*. **112**: 852-860.
- U'Ren, J.M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J. e Arnold, A.E. (2010). Community Analysis Reveals Close Affinities Between Endophytic and Endolichenic Fungi in Mosses and Lichens. *Microbial Ecology*. **60**: 340-353.
- Válega, M., Lillebø A.I., Pereira M.E., Duarte A.C. e Pardal M.A., (2008). Long-term effects of mercury in a salt marsh: Hysteresis in the distribution of vegetation following recovery from contamination. *Chemosphere* **71**: 765-772.
- Válega, M., Lima A.I.G., Figueira, E.M.A.P., Pereira E., Pardal M.A. e Duarte A.C. (2009). Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, *Halimione portulacoides* (L.) Aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure. *Chemosphere* **74**: 530-536.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor . (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Em: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White. *PCR protocols - a guide to methods and applications*. Academic Press Inc., San Diego, pp 315-322.
- Young-Hyun, Y., Yoon, H., Kang, S., Shin, J., Choo, Y., Lee, I., Lee, J. e Kim, J. (2012). Fungal Diversity and Plant Growth Promotion of Endophytic Fungi from Six Halophytes in Suncheon Bay. *Journal of Microbiology & Biotechnology*. **22**: 1549-1556.
- Zhang, T., Zhang, Y., Liu, H., Wei Y., Li, H., Su, J., Zhao, L. e Yu, L. (2013). Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *FEMS Microbiol Lett*. **341**: 52-61.





# Anexos

## Anexo 1 – “Primers” utilizados

Tabela VIII – Listagem dos “primers” utilizados neste trabalho, com a respetiva sequência nucleotídica.

“Primer”	Sequência 5’ – 3’
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G
BOXA1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC



## Anexo 2 – Marcador de peso molecular

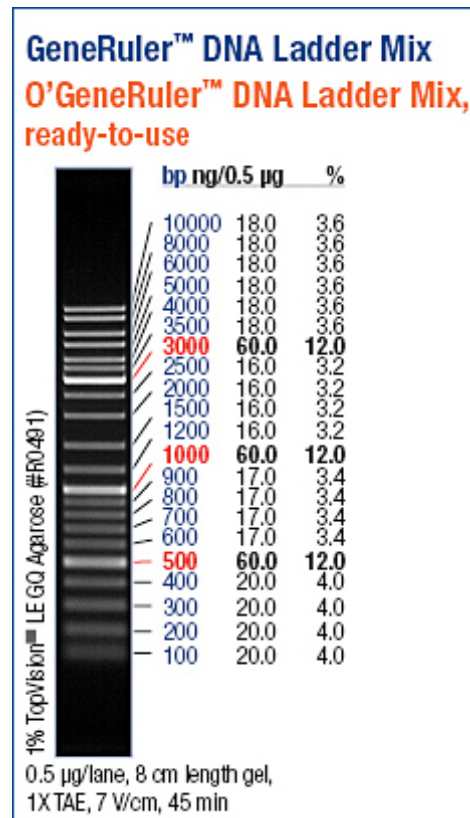


Fig. 16 – Marcador de peso molecular ([www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)) usado para normalização dos géis de perfis de bandas.



### Anexo 3 – Identificação dos isolados

Indexação de cada isolado a uma OTU, a partir dos dados fornecidos pela análise do dendograma de similaridade relativa à técnica de BOX-PCR com as árvores filogenéticas.

Tabela IX – Identificação dos isolados obtidos a partir das raízes de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Isolado	Identificação proposta	Local	Isolado	Identificação proposta	Local
R1	<i>Fusarium incarnatum</i>	A	R19	<i>Halophytophthora</i> sp.	B
R2	<i>Fusarium incarnatum</i>	A	R20	<i>Gibberella pulicaris</i>	B
R4	<i>Arthrinium kogelbergense</i>	A	R21	<i>Halophytophthora</i> sp.	B
R5	<i>Alternaria</i> sp.	A	R22	<i>Phytophthora humicola</i> / <i>inundata</i>	B
R6	<i>Alternaria</i> sp.	A	R23	<i>Phytophthora humicola</i> / <i>inundata</i>	B
R7	<i>Fusarium incarnatum</i>	A	R24	<i>Fusarium incarnatum</i>	E
R8	<i>Fusarium incarnatum</i>	A	R25	<i>Fusarium incarnatum</i>	E
R9	<i>Arthrinium kogelbergense</i>	A	R26	<i>Fusarium incarnatum</i>	E
R10	<i>Alternaria</i> sp.	A	R27	<i>Sarocladium strictum</i>	E
R11	<i>Arthrinium arundinis</i>	A	R28	<i>Sarocladium strictum</i>	E
R12	Pleosporales sp. V	A	R29	<i>Fusarium incarnatum</i>	B
R13	Pleosporales sp. V	A	R30	<i>Coniothyrium sporulosum</i>	E
R14	Pleosporales sp. V	A	R31	<i>Decorospora gaudefroyi</i>	E
R15	Pleosporales sp. V	A	R32	<i>Leptosphaeria contecta</i>	E
R16	<i>Dendryphiella salina</i>	A	R33	<i>Decorospora gaudefroyi</i>	E
R17	<i>Fusarium incarnatum</i>	B	R34	<i>Leptosphaeria contecta</i>	E
R18	<i>Halophytophthora</i> sp.	B			

Tabela X – Identificação dos isolados obtidos a partir dos caules de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Isolado	Identificação proposta	Local	Isolado	Identificação proposta	Local
C1	<i>Alternaria</i> sp.	A	C21	Pleosporales sp. IV	A
C2	<i>Alternaria</i> sp.	A	C22	<i>Ascochyta obiones</i>	A
C3	<i>Neofusicoccum australe</i>	A	C23	<i>Ascochyta obiones</i>	A
C4	Pleosporales sp. II	A	C24	Pleosporales sp. IV	A
C5	<i>Alternaria</i> sp.	A	C25	<i>Fusarium incarnatum</i>	B
C6	Pleosporales sp. IV	A	C26	Pleosporales sp. IV	E
C7	Pleosporales sp. III	A	C28	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	B
C8	Pleosporales sp. IV	A	C29	Pleosporales sp. I	B
C9	Pleosporales sp. II	A	C30	Pleosporales sp. I	B
C10	Pleosporales sp. II	A	C31	Pleosporales sp. I	B
C11	Pleosporales sp. III	A	C32	Pleosporales sp. I	E
C12	<i>Neofusicoccum australe</i>	A	C33	Pleosporales sp. I	E
C13	<i>Nigrospora oryzae</i>	A	C34	Pleosporales sp. I	E
C14	<i>Fusarium incarnatum</i>	A	C35	<i>Decorospora gaudefroyi</i>	E
C15	Pleosporales sp. V	A	C36	Pleosporales sp. I	E
C16	Pleosporales sp. II	A	C37	Pleosporales sp. I	E
C17	<i>Alternaria</i> sp.	A	C38	Pleosporales sp. I	B
C18	Pleosporales sp. II	A	C39	Pleosporales sp. I	B
C19	Pleosporales sp. II	A	C40	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	E
C20	Pleosporales sp. III	A	C41	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	E

Tabela XI – Identificação dos isolados obtidos a partir das folhas de *Halimione portulacoides*, com indicação do local de recolha.

Isolado	Identificação proposta	Local	Isolado	Identificação proposta	Local
ER1	<i>Ascochyta obiones</i>	A	F21	Pleosporales sp. II	A
F1	<i>Neofusicoccum australe</i>	A	F22	Pleosporales sp. III	A
F2	Pleosporales sp. IV	A	F23	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F3	Pleosporales sp. III	A	F24	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F4	Pleosporales sp. II	A	F25	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F5	Pleosporales sp. IV	A	F26	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F6	Pleosporales sp. III	A	F27	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F7	Pleosporales sp. III	A	F28	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F8	<i>Penicillium</i> sp.	A	F29	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	B
F9	Pleosporales sp. II	A	F30	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	E
F10	Pleosporales sp. IV	A	F31	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	E
F11	Pleosporales sp. V	A	F32	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	E
F12	Pleosporales sp. V	A	F33	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	E
F14	Pleosporales sp. IV	A	F34	Pleosporales sp. I	B
F15	Pleosporales sp. V	A	F35	Pezizomycetes sp.	E
F16	Pleosporales sp. II	A	F36	<i>Halophytophthora polymorphica</i>	E
F18	Pleosporales sp. IV	A	F37	<i>Xylaria</i> sp.	E
F19	Pleosporales sp. IV	A	F38	Pleosporales sp. I	E
F20	Pleosporales sp. V	A	F39	Pleosporales sp. I	E





## Anexo 4 – Resultados dos testes enzimáticos

Tabela XII – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de raízes de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).

[illegible]

Tabela XIII – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de caules de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).

[illegible]

Tabela XIV – Enzimas extracelulares produzidas, em cultura, por isolados obtidos de folhas de *Halimione portulacoides* (+ indica presença de atividade enzimática; - indica ausência de atividade enzimática).

[illegible]

